

Aus der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
Campus Virchow-Klinikum der Charité,
Humboldt-Universität zu Berlin

**Evaluation von Granulozyten Kolonie-Stimulierendem Faktor (G-CSF) und einem
monoklonalen Antikörper gegen Kapselpolysaccharid zur Therapie der
experimentellen *Klebsiella pneumoniae*-Pneumonie:
Direkte Interaktion des
hämatopoetischen Wachstumsfaktors mit dem Bakterium steigert dessen Virulenz**

Der Medizinischen Fakultät
Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin
als Habilitationsschrift
zur Erlangung der *venia legendi*
vorgelegt von

Dr. med. Thomas Held

Berlin, 2000

Abstrakt

G-CSF besitzt direkte Effekte auf die Aktivierung bakterizider Eigenschaften neutrophiler Granulozyten und verbessert das Überleben bakteriell infizierter Tiere. Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Effekt einer prophylaktischen oder therapeutischen Gabe von G-CSF bei experimenteller Pneumonie durch *Klebsiella pneumoniae* in Mäusen untersucht. Unerwarteterweise verschlechterte aber eine prophylaktische G-CSF-Gabe das Überleben und führte dosisabhängig zu einer Steigerung der bakteriellen Dissemination von der Lunge in Leber und Milz. Im Gegensatz dazu konnte ein spezifisch gegen K2-Kapselpolysaccharid (K2-KPS) von *K. pneumoniae* gerichteter monoklonaler Antikörper signifikant die Vermehrung der Bakterien in Lunge, Leber und Milz reduzieren. Die Blockierung von TNF- α durch Pentoxifyllin hingegen verzögerte die Letalität nach Induktion der Pneumonie, verhinderte sie jedoch nicht. In vitro konnte hier nachgewiesen werden, daß G-CSF spezifisch an *K. pneumoniae* bindet und daß diese Bindung an mehrere Proteine mit einem Molekulargewicht von 41, 25 und 21 kDa erfolgt. Die Bindung von G-CSF an *K. pneumoniae* führte zu einer signifikant erhöhten Produktion des wichtigsten Virulenzfaktors, K2-KPS. Dies verminderte in vitro signifikant eine Phagozytose der Bakterien durch neutrophile Granulozyten. Damit gelang es zum ersten Mal, die Bindung von G-CSF an ein gram-negatives Bakterium, *K. pneumoniae*, nachzuweisen und zu zeigen, daß diese Bindung in vitro zu einer erhöhten Produktion des wichtigsten Virulenzfaktors und in vivo zur Verschlechterung einer experimentellen Pneumonie durch erhöhte bakterielle Disseminierung bei prophylaktischer Gabe von G-CSF vor Infektion führt. Die weitere Untersuchung dieser Phänomene hinsichtlich einer möglichen Bindung von G-CSF auch an andere Bakterien könnte zu einer differenzierten supportiven Therapie bakterieller Infektionen mit G-CSF in nicht neutropenischen Patienten führen.

Schlagworte:

Klebsiella pneumoniae, Granulocyte Colony-Stimulating Factor, Virulenz, Bindungsstellen

Abstract

Besides its well-established effects on granulocytopoiesis, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) has been shown to have direct effects on the recruitment and bactericidal ability of neutrophils, resulting in improved survival of experimentally infected animals. The effect of G-CSF on the course of experimental pneumonia induced by *Klebsiella pneumoniae* was studied. Using a highly reproducible murine model, the paradoxical finding that mortality from infection was significantly increased when animals received G-CSF before induction of pneumonia could be demonstrated. Administration of G-CSF promoted replication of bacteria in the liver and spleen, thus indicating an impairment rather than an enhancement of antibacterial mechanisms. By contrast, a monoclonal antibody against *Klebsiella* K2 capsule significantly reduced bacterial multiplication in the lung, liver, and spleen, and abrogated the increased mortality caused by G-CSF. Blocking of TNF- α with pentoxifylline, however, could not prevent increased mortality caused by G-CSF. In vitro studies showed a direct effect of G-CSF on *K. pneumoniae* resulting in increased capsular polysaccharide (CPS) production. When bacteria were coincubated with therapeutically achievable concentrations of G-CSF, phagocytic uptake and killing by neutrophils was impaired. Western blot analysis showed three binding sites of G-CSF to *K. pneumoniae*. Thus, in this model, the direct effect of G-CSF on a bacterial virulence factor, CPS production, outweighed any beneficial effect of G-CSF on recruitment and stimulation of leukocytes. Further investigations of possible binding of G-CSF to other bacteria might influence a differentiated supportive therapy of bacterial infections in non-neutropenic patients with this growth factor.

Keywords:

Klebsiella pneumoniae, Granulocyte Colony-Stimulating Factor, Virulence, Binding Sites

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1.	Allgemeine Betrachtungen	4
1.2.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
1.2.1.	Bakterielle Virulenzfaktoren	5
1.2.1.1.	Kapselpolysaccharid (KPS)	5
1.2.1.2.	Lipopolysaccharid (LPS)	6
1.2.2.	Situation bei einer Pneumonie durch <i>K. pneumoniae</i>	6
1.3.	Auf Antikörper basierende antibakterielle Therapieansätze	7
1.4.	Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)	8
1.4.1.	In vitro-Produktion von G-CSF	9
1.4.2.	Wirkungen von G-CSF auf bei einer bakteriellen Infektion wichtigen Zellarten	9
1.4.3.	G-CSF in der Behandlung experimenteller Infektionen	10
2.	Problemstellung	12
3.	Material und Methoden	13
3.1.	Tiere	13
3.2.	Bakterien	13
3.3.	Zytokine, Antikörper und Reagenzien	13
3.4.	Tierversuche	14
3.4.1.	Wirksamkeit des verwendeten G-CSF	14
3.4.2.	Experimentelle Pneumonie und Versuchsprotokolle	14
3.5.	Immunoblotting	17
3.6.	Bindung von ¹²⁵ J-markiertem G-CSF an <i>K. pneumoniae</i>	18
3.7.	In vitro-Produktion von KPS in der Gegenwart von G-CSF	18
3.8.	Mikrophagozytose-Assay	18
3.8.1.	Präparation der Granulozyten und des Serums	18
3.8.2.	Mikrophagozytose-Assay	19
3.9.	Statistische Analyse	20
4.	Ergebnisse	21
4.1.	Effekt des rekombinanten humanen G-CSF im verwendeten Mausstamm	21
4.2.	Einfluß von G-CSF auf die experimentelle <i>K. pneumoniae</i> -Pneumonie	23
4.2.1.	Überleben	23
4.2.2.	Klinischer Verlauf	24
4.2.3.	Quantitative Bestimmung der Keimzahlen	25
4.2.4.	Histologische Befunde	28
4.3.	Einfluß des gegen K2-Kapselpolysaccharid gerichteten monoklonalen Antikörpers mAb III/5-1 auf die experimentelle <i>K. pneumoniae</i> -Pneumonie	28
4.3.1.	Überleben	28
4.3.2.	Klinischer Verlauf	29
4.3.3.	Quantitative Bestimmung der Keimzahlen	30
4.3.4.	Histologische Befunde	32
4.4.	Einfluß von Pentoxifyllin auf die experimentelle <i>K. pneumoniae</i> -Pneumonie	32
4.4.1.	Überleben	33
4.4.2.	Klinischer Verlauf	34

4.4.3.	Quantitative Bestimmung der Keimzahlen	34
4.4.4.	Histologische Befunde	35
4.5.	Interaktion von G-CSF mit <i>K. pneumoniae</i> in vitro	36
4.5.1.	Wachstumsverhalten von <i>K. pneumoniae</i> unter dem Einfluß von G-CSF	36
4.5.2.	Einfluß von G-CSF auf die Produktion von zellgebundenem KPS	38
4.6.	Funktionelle Bedeutung der Erhöhung der Produktion von zellgebundenem KPS durch G-CSF	40
4.7.	Bindung von G-CSF an <i>K. pneumoniae</i>	41
4.7.1.	Bindung von ¹²⁵ J-G-CSF an <i>K. pneumoniae</i>	41
4.7.2.	Immunoblotting	44
5.	Diskussion	46
5.1.	Wirkung des G-CSF im verwendeten Mausstamm	46
5.2.	G-CSF verschlechtert das Überleben bei einer experimentellen <i>K. pneumoniae</i> -Pneumonie	46
5.2.1.	G-CSF fördert die bakterielle Dissemination bei experimenteller <i>K. pneumoniae</i> -Pneumonie	48
5.2.2.	Einfluß des Zeitpunktes der G-CSF-Therapie auf den Verlauf der experimentellen <i>K. pneumoniae</i> -Pneumonie	49
5.3.	Einfluß des monoklonalen Antikörpers gegen KPS auf den Verlauf der experimentellen <i>K. pneumoniae</i> -Pneumonie und Synergismus mit G-CSF	50
5.4.	Die mögliche Beteiligung von TNF- α an den Leberzellnekrosen bei prophylaktischer Behandlung einer experimentellen <i>K. pneumoniae</i> -Pneumonie durch G-CSF	51
5.4.1.	Effekte von Pentoxifyllin auf TNF- α	52
5.4.2.	Einfluß von Pentoxifyllin auf die experimentelle <i>K. pneumoniae</i> -Pneumonie und den Effekt einer prophylaktischen G-CSF-Gabe	52
5.5.	Ist eine pulmonale Schädigung durch G-CSF für die erhöhte Letalität verantwortlich?	53
5.6.	Gibt es eine andere Erklärung für die Beobachtungen?	55
5.6.1.	Direkte Effekte von G-CSF auf <i>K. pneumoniae</i>	56
5.6.2.	G-CSF bindet spezifisch an <i>K. pneumoniae</i>	56
5.6.3.	Vergleich der Befunde mit anderen tierexperimentellen Untersuchungen unter dem Gesichtspunkt einer direkten Wachstumsfaktor-Bakterien-Interaktion	59
6.	Zusammenfassung	60
7.	Literatur	62
8.	Danksagung	88
9.	Anhang	89
9.1.	Farbabbildungen	89
9.2.	Verwendete Abkürzungen	97

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Betrachtungen

Die zytostatische Therapie bösartiger Erkrankungen führt häufig zur Granulozytopenie. In Abhängigkeit von Ausmaß und Dauer der Granulozytopenie nimmt das Risiko von Infektionen zu. Diese nehmen oft einen raschen progredienten Verlauf; Fieber ist als klinisches Symptom häufig das einzige Zeichen einer Infektion. Die Entwicklung zum septischen Schock bei Bakteriämien tritt in etwa 40% aller Fälle auf, mit einer hohen Letalität zwischen 40 und 90%. Komplizierend kommt hinzu, daß sich Resistenzen und Mehrfachresistenzen bei klinisch bedeutsamen Bakterien immer mehr ausbreiten und somit die antibiotische Therapie von Infektionen erheblich erschweren. Deshalb ist es von großer Wichtigkeit, anti-infektiöse Therapiestrategien zu evaluieren, die ergänzend zu Antibiotika eingesetzt werden können. In dieser Hinsicht sind unter anderem zwei Ansätze von Interesse, die zum einen den Einsatz von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren {4247}, zum anderen das Konzept einer passiven Immunisierung gegen spezifische bakterielle Virulenzfaktoren untersuchen {3819} {3802} {3801}.

In der hier vorgelegten Arbeit wird anhand des tierexperimentellen Modells einer Pneumonie mit nachfolgender Sepsis durch *Klebsiella pneumoniae* der Einsatz von granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) und einem monoklonalen Antikörper gegen den wichtigsten Virulenzfaktor von *K. pneumoniae* untersucht.

1.2. *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae ist eines der bei schweren nosokomialen Infektionen am häufigsten isolierten Bakterien {747} {728} {740} {298} {755} {730}. In erster Linie werden durch diesen Keim Pneumonien, Bakteriämien und Harnwegsinfektionen hervorgerufen {755} {731} {876}. Pulmonale Infektionen zeigen häufig besonders schwere Verläufe durch multilobulären Befall, rasch progredienten klinischen Verlauf und durch die Ausbildung von Abszessen {2548} {729}. Auffallend ist die hohe Letalität von 40 – 60% und mehr trotz adäquater Antibiotikatherapie {298} {3815} {876}.

Erschwerend kommt hinzu, daß die Anzahl gegenüber häufig verwendeten Antibiotika resistenter Isolate zunimmt. Die neuen Resistenzenzyme mit erweitertem Spektrum

(extended-spectrum β -Laktamasen, ESBL) werden ungewöhnlich häufig bei Klebsiellen beschrieben, die Ursache hierfür ist unbekannt. Es handelt sich gewöhnlich um Isolate aus nosokomialen Infektionen {102}{719}{3950}{724}{3511}. Teilweise findet sich eine deutliche Korrelation zwischen der zunehmenden Anwendung bestimmter Antibiotika und einer steigenden Frequenz ESBL-bildender Isolate von *K. pneumoniae* {724}{2546}.

1.2.1. Bakterielle Virulenzfaktoren

1.2.1.1. Kapselpolysaccharid (KPS)

Der wahrscheinlich wichtigste Virulenzfaktor von *K. pneumoniae* ist das Kapselpolysaccharid (KPS) {2267}{3818}. Zum einen verhindert KPS die Phagozytose der Bakterien durch neutrophile Granulozyten {3006}, zum anderen wird KPS während des bakteriellen Wachstums und durch den Einfluß antimikrobieller Substanzen freigesetzt {106}{2008}. Im Rahmen einer schweren Infektion ließen sich bei einem Patienten hohe Mengen an KPS im Serum nachweisen, die bei erfolgreicher Behandlung wieder verschwanden {106}. Während der Wachstumsphase der Keime verbindet sich dieses KPS mit Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin) und Proteinen und formt einen toxischen Komplex, der für die durch *Klebsiella* typischerweise verursachten Nekrosen bei Pneumonien verantwortlich gemacht wird {762}{763}. Erschwerend kommt hinzu, daß bei nur subinhibitorischen Konzentrationen von Antibiotika, wie sie z.B. in Abszessen beobachtet werden können, die Bakterien vermehrt KPS produzieren {2008}.

Siebenundsiebzig verschiedene KPS-Serotypen sind bei der Species *Klebsiella* bekannt {4481}. Zwar konnten einige Studien ein Vorherrschen bestimmter Serotypen in klinischen Isolaten nicht nachweisen {3810}{3818}, andere Untersuchungen erbrachten jedoch eine vermehrte Isolation der Serotypen K2, K21 und K7 bei Infektionen des Respirations- und des Urogenitaltraktes {851}{735}{739}{3800}.

1.2.1.2. Lipopolysaccharid (LPS)

Ein weiterer Virulenzfaktor ist LPS, ein wichtiger Mediator des septischen Schocks. Neben diesen zytokin-vermittelten Effekten ist das LPS von *K. pneumoniae* für die Resistenz des Bakteriums gegenüber der Serumbakterizidie verantwortlich, KPS dagegen scheint in dieser Hinsicht keine Rolle zu spielen {3806}. LPS alleine jedoch ist nicht hinreichend, um eine experimentelle pulmonale Infektion mit virulenten Klebsiellen auch letal enden zu lassen. In einer Versuchsreihe mit verschiedenen Klebsiellenstämmen, die sich in der Produktion von KPS (bzw. der fehlenden Produktion von KPS) verschiedener Serotypen unterschieden, konnte nachgewiesen werden, daß die Gabe selbst sehr hoher Keimzahlen nicht letal ist, wenn kein KPS oder KPS eines anderen Serotyps als K2 und K1 produziert wird {4155}. Die Keimzahlen (lethal dose₅₀, LD₅₀) lagen über 5×10^6 koloniebildende Einheiten (KBE) für *K. pneumoniae* 7380 (Serotyp O2ab:K–), über $1,33 \times 10^7$ KBE für *K. pneumoniae* F201 (Serotyp O1:K–) und über $8,25 \times 10^7$ KBE für *K. pneumoniae* 390 (Serotyp O3:K11) {4155}. Hingegen waren sehr geringe Keimzahlen der Klebsiellenstämme B5055 und A5054 letal, wobei sich der Stamm B5055, der KPS des Serotyps K2 produziert, als virulenter erwies als der Stamm A5054 mit KPS des Serotyps K1. Es spielte dabei keine Rolle, ob die infizierte Maus gegenüber LPS empfindlich oder unempfindlich war {4155}. So betrug die LD₅₀ bei LPS-sensiblen Mäusen (Stämme ICR und C3H/HeN) für *K. pneumoniae* B5055 (Serotyp O1:K2) 5×10^2 KBE und bei LPS-unempfindlichen Mäusen (Stamm C3H/HeJ) $2,27 \times 10^2$ KBE {4155}.

1.2.2. Situation bei einer Pneumonie durch *K. pneumoniae*

Wie bereits erwähnt, zeichnet sich die durch *K. pneumoniae* verursachte Pneumonie durch einen raschen Verlauf mit hoher Letalität aus. Die wichtigsten Virulenzfaktoren von Seiten der Bakterien sind KPS und LPS; auf Seiten des Wirtes sind als wichtigste Abwehrfaktoren von zellulärer Seite her neutrophile Granulozyten und, im Fall einer pulmonalen Infektion, Alveolarmakrophagen zu nennen {4241}. Die entscheidenden humoralen Faktoren und Zytokine sind TNF- α , Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-2, IFN- γ , ICAM-1 und Nitric Oxide (NO). Die Inhibierung von TNF- α erhöht die Letalität und die Keimzahl in der Lunge {4242}, die Behandlung mit einem TNF- α -Agonisten hingegen hat genau die entgegengesetzten Effekte {4240}. Die Be-

deutung von TNF- α bei der Abwehr bakterieller Infektionen über z.B. Aktivierung neutrophiler Granulozyten konnte auch bei der experimentellen Legionellenpneumonie {4199}, der experimentellen *Pneumocystis carinii*-Pneumonie {4194} und bei der experimentellen *S. typhimurium*-Peritonitis nachgewiesen werden {4182}. Die Gabe von IFN- γ vor experimenteller Wundinfektion durch *K. pneumoniae* erhöht das Überleben, ohne additive oder synergistische Wirkung mit TNF- α zu zeigen {4180}. Bei anderen Infektionsmodellen jedoch war ein Synergismus von IFN- γ mit TNF- α hinsichtlich der protektiven Wirkung dieser Zytokine nachweisbar {4182} {4179}. Das MIP-2 ist bei der experimentellen *K. pneumoniae*-Pneumonie erhöht nachweisbar, seine Inhibierung verschlechtert das Überleben und erhöht das bakterielle Wachstum {3120}. Bei *K. pneumoniae*-Pneumonie wird ICAM-1 vermehrt auf Alveolarmakrophagen exprimiert, das Fehlen dieser Expression geht mit erhöhter Letalität, verminderter bakterieller clearance und verminderter Phagozytose und Abtötung der Keime durch Alveolarmakrophagen einher {4234}. Schließlich wurde auch eine vermehrte Bildung von NO bei der experimentellen *K. pneumoniae*-Pneumonie nachgewiesen; die Blockierung der NO-Produktion hatte ebenfalls ein gesteigertes bakterielles Wachstum sowie die Abnahme der Phagozytose und Abtötung der Bakterien durch Alveolarmakrophagen zur Folge {4243}. Der Verlauf einer *K. pneumoniae*-Pneumonie wird also nicht nur durch Virulenzfaktoren der Bakterien, sondern auch durch ein komplexes Zusammenspiel pro- und anti-inflammatorischer Faktoren auf der Seite des infizierten Wirtes bestimmt.

1.3. Auf Antikörper basierende antibakterielle Therapieansätze

Die zunehmende Resistenz pathogener Bakterien gegenüber herkömmlichen Antibiotika veranlaßte die Entwicklung verschiedener, von Antibiotika unabhängigen therapeutischen Ansätze, wovon einige auf dem Einsatz von Antikörpern gegen bakterielle Virulenzfaktoren beruhen. So waren monoklonale Antikörper gegen KPS und LPS von *E. coli* oder *K. pneumoniae* im Tierexperiment protektiv, einhergehend mit einer Reduktion von zirkulierendem TNF- α und förderten die Phagozytose von *E. coli* durch humane neutrophile Granulozyten und Mausmakrophagen in vitro {3801} {3802}. Antikörper gegen die Polysaccharidketten des LPS von *E. coli* waren in Zusammenwirken mit Komplement protektiv, dies jedoch nur gegen den *E. coli* – Stamm, gegen den sie gerichtet waren, nicht aber gegen serologisch unterschiedliche *E. coli* – Stämme

{3955}. Die antibakterielle Wirkung monoklonaler Antikörper ist dosisabhängig {3807}. Die passive Immunisierung mit Hyperimmunserum gegen *K. pneumoniae*, das von geimpften Freiwilligen gewonnen wurde, war im klinischen Einsatz jedoch nicht erfolgreich {3819}.

Der ideale Angriffsort für eine Antikörpertherapie ist noch nicht endgültig geklärt. Zwar konnte gezeigt werden, daß spezifische Antikörper gegen LPS die Kapsel von *K. pneumoniae* durchdringen können {3796}. Diese Antikörper sind in vitro auch opsonierend und phagozytosefördernd, jedoch schwächt das Vorhandensein einer Kapsel diese Wirkung ab {4249}. Dies wird tierexperimentell bestätigt durch die etwa 100-fach höhere Menge von anti-LPS-Antikörpern im Vergleich zu einem gegen KPS gerichteten monoklonalen Antikörper, die für einen 50 %-igen Schutz notwendig ist {3797}. Ein gegen KPS gerichteter Antikörper jedoch war in einem Mausmodell der Sepsis, bei dem die Keime intravenös gegeben wurden, protektiv {98}. Auch in einem die klinische Situation besser reflektierenden Pneumoniemodell bei der Ratte, bei dem *K. pneumoniae* intrabronchial gegeben wurde, konnte dieser Antikörper die Schwere der Infektion mindern und die septische Streuung der Bakterien reduzieren {218}.

1.4. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)

Verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflussen Überleben, Proliferation, Differenzierung und funktionelle Kapazitäten hämatopoietischer Zellen. Unter diesen sind Interleukin (IL)-3, -5, -6, -11, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) und granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) am besten untersucht {4247}. Von diesen wiederum sind nur GM-CSF und G-CSF für die klinische Anwendung am Patienten zugelassen; M-CSF wurde in klinischen Studien bereits geprüft {1453} {1880} {1643}.

Das Risiko einer Infektion ist nicht nur mit dem Schweregrad, sondern auch mit der Dauer einer Neutropenie eng korreliert {4161}. Obwohl G-CSF die Dauer einer Neutropenie durch Beschleunigung der Differenzierung und Proliferation hämatopoetischer Stammzellen abkürzt {707} {2424} {716}, konnte bislang eine Reduktion der durch schwere Infektionen bedingten Letalität durch G-CSF nicht überzeugend nachgewiesen werden, wenn die Neutropenie Folge einer Chemotherapie war

{1867} {4153} {4159} {4147}. Unbestritten jedoch ist der Einsatz von G-CSF bei angeborenen Defekten wie der schweren kongenitalen Neutropenie {194} {707} {4151} {1729} oder bei Neutropenien anderer Ursachen {718} {715}.

1.4.1. In vitro-Produktion von G-CSF

Bereits 1971 konnte nachgewiesen werden, daß LPS die Produktion von G-CSF erhöht {1989}. G-CSF wird von verschiedenen hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen synthetisiert {173} {3896} {206} {1722} {1988}. Durch Stimulation mit IL-1, LPS oder TNF- α kann eine dosisabhängige Steigerung der Produktion von G-CSF durch humane Endothelzellen induziert werden {3896}, vermutlich über den Signaltransduktionsfaktor NF-IL6 {4118}. Interferon (IFN)- γ hingegen kann die stimulatorische Wirkung von IL-1, LPS und TNF- α herunterregulieren {3896}. LPS und die Bindung von Fibronectin und Vitronectin an Makrophagen sind ebenfalls potente Stimuli für die Expression von G-CSF in den Makrophagen {3879}. Auch die direkte Koinkubation von Makrophagen mit einer von G-CSF abhängigen Promyelozyten-Leukämie-Zelllinie führt zur erhöhten Produktion von G-CSF, so daß nicht nur Zytokine, sondern auch Adhäsion und direkter Zell-Zell-Kontakt die Produktion von G-CSF regulieren {3879}.

1.4.2. Wirkungen von G-CSF auf bei einer bakteriellen Infektion wichtige Zellen

Im Vergleich zu Lymphozyten und Monozyten haben neutrophile Granulozyten in vitro und in vivo nur eine sehr kurze Lebensdauer {1912} {4162} {4163}. G-CSF, aber auch LPS verlängern diese durch Inhibierung der Apoptose {3493} {3908}. IL-10 hingegen verhindert in vitro die Inhibierung der Apoptose durch G-CSF {3908}. G-CSF verstärkt ebenfalls die funktionelle Aktivität ausgereifter Leukozyten in Konzentrationen, die für eine Proliferation zu gering sind. Die physiologische Bedeutung dieser Befunde in der Abwehr bakterieller Infektionen ist jedoch noch weitgehend ungeklärt {1977}.

Über weitere Wirkungen von G-CSF gibt es zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. So berichten Untersuchungen, daß G-CSF keine direkte Stimulation des „oxidative burst“ und der Produktion von Sauerstoffradikalen in neutrophilen Granulozyten bewirkt

{4051}{1699}{1703}. Andere Untersuchungen hingegen zeigen, daß dies unter bestimmten Bedingungen durchaus der Fall sein kann. So konnte der oxidative burst bei adhärennten Neutrophilen durch G-CSF gesteigert werden {167}, und die mit G-CSF vorbehandelten Neutrophilen antworteten mit einem gesteigerten oxidativen burst auf eine Stimulation mit fMLP {167}{148}{3293}{138}{195}. Dies war in einer vergleichenden Untersuchungen jedoch nur bei im Blut zirkulierenden, jedoch nicht bei im Gewebe befindlichen neutrophilen Granulozyten der Fall {3293}. Zusätzlich zeigt G-CSF noch eine Vielzahl anderer Wirkungen auf neutrophile Granulozyten (Übersicht in {177}).

G-CSF wirkt aber nicht nur auf neutrophile Granulozyten. Bei peritonealen Makrophagen wurde eine Erhöhung der Pinozytose beobachtet {1629}. Die Größe von Alveolarmakrophagen nahm unter dem Einfluß von G-CSF zu {126}; Alveolarmakrophagen wurden in vitro durch G-CSF zu vermehrtem Abtöten phagozytierter Bakterien stimuliert {4215}. Auch die Produktion von TNF- α durch Alveolarmakrophagen auf Stimulation durch LPS oder Bakterien wurde durch Vorbehandlung der Zellen mit G-CSF gesteigert {4215}. Proliferation und Migration von Endothelzellen wurde durch G-CSF ebenfalls erhöht {192}; die Differenzierung unreifer Monozyten wurde durch G-CSF ebenfalls induziert {1597}. Die pleiotrope Wirkung dieses Wachstumsfaktors wird auch dadurch deutlich, daß er die durch LPS und IFN- γ induzierte Mehrexpression der iNOS-mRNA und die Produktion von NO in glatten Muskelzellen der Gefäße inhibiert {4119}. In Hepatozyten vermag G-CSF die Expression von iNOS, cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) und ICAM-1 zu induzieren {4120}.

1.4.3. G-CSF in der Behandlung experimenteller Infektionen

Frühe Therapiestudien mit G-CSF bei experimentellen Infektionen zeigten unabhängig vom infektiösen Agens und vom verwendeten Tiermodell durchweg Verbesserung des Überlebens und Verstärkung antibakterieller Mechanismen. In einem Pneumoniemodell, bei dem Ratten intratracheal mit *K. pneumoniae* infiziert wurden, konnte die Behandlung mit G-CSF nicht nur den Einstrom neutrophiler Granulozyten in die Lunge, sondern auch das Überleben der behandelten Tiere verbessern {77}. Eine pulmonale Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* bei splenektomierten Mäusen konnte ebenfalls

erfolgreich mit G-CSF therapiert werden, wobei Überleben und die Verminderung der Keime in der Lunge signifikant gegenüber Kontrollgruppen verbessert wurde {2643}. Der gleiche Befund (signifikante Verbesserung des Überlebens) wurde durch G-CSF in einem Peritonitis-Modell erreicht {2563}. Neutropenische Mäuse, die entweder intra-peritoneal mit *Pseudomonas aeruginosa* oder systemisch intravenös mit *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oder *Candida albicans* infiziert wurden, zeigten mit G-CSF ein signifikant besseres Überleben und eine schnellere Elimination der Mikroorganismen als Kontrolltiere {2569}. Auch bei Infektionen in neutropenischen Mäusen, die auf Antibiotika schlecht ansprachen, half die therapeutische Gabe von G-CSF, Letalität und Keimzahlen in der Leber zu senken {3043}. Synergistische Wirkung von G-CSF und Antibiotika auf das Überleben wurden ebenfalls bei polymikrobieller intraabdomineller Infektion und bei intramuskulärer Infektion beobachtet {2377} {75}. Die Inaktivierung des G-CSF-Genes durch homologe Rekombination ("knockout"-Mäuse) führt zu einer chronischen Neutropenie, und die Infektion dieser Tiere mit *Listeria monocytogenes* resultiert nicht nur in einer schweren Infektion mit erhöhter Letalität gegenüber Kontrolltieren, sondern auch im Ausbleiben einer Neutrophilie nach Infektion {2554}. Dies zeigt, daß G-CSF nicht nur für die Aufrechterhaltung einer genügenden Anzahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten, sondern auch für die Induktion einer Neutrophilie bei bakterieller Infektion wichtig ist. Die durch G-CSF vermittelten protektiven Effekte bei bakteriellen Infektionen scheinen darüberhinaus auf einer Verstärkung der Phagozytose-Aktivität und des respiratory burst sowie auf der vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf neutrophilen Granulozyten zu beruhen {140} {3873}.

2. Problemstellung

Die Behandlung nosokomialer Pneumonien, vor allem die durch *K. pneumoniae* verursachten, wird aufgrund der zunehmenden Resistenzen gegenüber Antibiotika immer schwieriger. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei nicht auf dem Einsatz von Antibiotika basierende antimikrobielle Therapieansätze zu evaluieren. Folgende spezifische Fragen wurden bearbeitet:

Kann der Einsatz von G-CSF vor oder nach Induktion der experimentellen Pneumonie durch *K. pneumoniae* diese günstig beeinflussen?

Kann der Einsatz eines gegen K2-KPS gerichteten monoklonalen Antikörpers vor oder nach der Induktion der experimentellen *K. pneumoniae*-Pneumonie diese günstig beeinflussen?

Der zum Einsatz gelangende monoklonale Antikörper wirkt opsonisierend [98], seine Verteilung in verschiedenen Geweben muß aber nicht zwingend gleichmäßig sein. Damit ist es möglich, daß er nicht in effektiven Konzentrationen am Ort der Infektion vorliegt. Andererseits benötigen opsonisierende Antikörper neutrophile Granulozyten, um effektiv die Beseitigung von Bakterien beschleunigen zu können. Somit stellt sich die Frage nach einem Synergismus zwischen G-CSF und dem monoklonalen Antikörper.

Die alleine mit G-CSF behandelten Tiere zeigten einen signifikant schlechteren Verlauf als die Kontrolltiere und die mit dem monoklonalen Antikörper gegen K2-KPS behandelten Tiere. Durch diese unerwarteten Ergebnisse ergaben sich weitere Fragen:

Ist eine eventuell durch G-CSF bedingte überschießende Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ für den letalen Ausgang der Therapie verantwortlich?

Ist eine eventuell durch G-CSF bedingte pulmonale Schädigung bei der Therapie der experimentellen *K. pneumoniae*-Pneumonie mit G-CSF für die erhöhte Letalität verantwortlich?

Existiert eine direkte Wirkung von G-CSF auf *K. pneumoniae*?

3. Material und Methoden

3.1. Tiere

Pathogenfreie weibliche BALB/c-Mäuse wurden von der Tierzucht Abteilung des Institutes für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie der Freien Universität Berlin bezogen. Bei Verwendung wogen sie zwischen 20 und 25 Gramm. Der freie Zugang zu Wasser und Standardfutter war jederzeit gewährleistet. Die Tiere wurden unter einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tierversuche wurden von der Senatsverwaltung für Gesundheit des Senates von Berlin genehmigt.

3.2. Bakterien

Klebsiella pneumoniae B5055 vom Serotyp O1:K2 {2008} und *K. pneumoniae* F201 vom Serotyp O1:K– {1859} wurden für die Untersuchungen verwendet. Zu tierexperimentellen Studien wurden die Keime von einer auf Trypticase-Soja-Agar (Difco, Detroit, USA) ausplattierten Einzelkolonie auf Trypticase-Soja-Bouillon (TSB, Difco, Detroit, USA) überimpft und bei 37°C und end-über-end-Rotation für 4 Stunden bebrütet. Anschließend wurden sie zentrifugiert (1560 x g, 15 Minuten, 4°C), einmal mit steriler Kochsalzlösung (0,9%) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde mit steriler Kochsalzlösung aufgenommen und die bakterielle Konzentration mittels einer Standardkurve, die in Vorversuchen erstellt wurde, spektrophotometrisch ermittelt. Danach wurde die gewünschte Konzentration an koloniebildenden Einheiten (KBE) durch Verdünnung mit Kochsalzlösung hergestellt. Bis zur Verwendung im Tierexperiment wurden die Bakterien auf Eis gekühlt. Alle spektrophotometrisch ermittelten KBE wurden mit zehnfacher Verdünnungsreihe und anschließendem Ausplattieren im Doppelansatz auf Trypticase-Soya-Agar überprüft. Die Bebrütung der Agarplatten zur Ermittlung der KBE erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.3. Zytokine, Antikörper und Reagenzien

Rekombinantes humanes G-CSF (Filgrastim) wurde steril und pyrogenfrei von AMGEN (München) bezogen und subkutan verabreicht. Der monoklonale Antikörper III/5-1 (mAb III/5-1) ist ein für Kapselpolysaccharid des Serotyps K2 von *K. pneumoniae* spezifisches IgM von der Maus, dessen Herstellung und Aufreinigung bereits beschrieben wurde {98} {218}. Er wurde intravenös gegeben. Pentoxifyllin wurde ebenfalls ste-

ril und pyrogenfrei von Albert-Roussel (Wiesbaden) bezogen und intraperitoneal verabreicht. Die entsprechenden Verdünnungen wurden mit steriler phosphatgepufferter Saline (PBS) hergestellt. Alle Reagenzien und das PBS wurden auf ihren LPS-Gehalt mit einem limulus amebocyte lysate-Assay (Chromogenix, Mölndal, Schweden) überprüft. Der Assay weist LPS (*E. coli* O111:B4) ab einer Konzentration von >1 pg/ml nach. In keiner der bei einem Tierversuch verwendeten Reagenzien konnte mit diesem Assay LPS nachgewiesen werden.

3.4. Tierversuche

3.4.1. Wirksamkeit des verwendeten G-CSF

Alle Tierversuche wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionssimmunologie der Freien Universität Berlin durchgeführt (Leiter: Prof. Dr. med. H. Hahn). Um die Wirkung des G-CSF im verwendeten Mausstamm sicherzustellen, wurde den Tieren an vier aufeinanderfolgenden Tagen jeweils zweimal täglich in 12-stündigem Abstand G-CSF in drei verschiedenen Dosierungen (15 µg/kg, 50 µg/kg und 250 µg/kg) subkutan gespritzt. Täglich vor der ersten G-CSF-Gabe wurde den Tieren aus einer Schwanzvene 20 µl Blut abgenommen. Um einen Effekt der Blutabnahme auf die Leukozytenzahl und das Differentialblutbild zu erkennen, wurde mit der Blutabnahme 4 Tage vor der ersten G-CSF-Gabe begonnen. Die Leukozytenzahl wurde mit einem Coulter Counter (Modell DN, Coulter Electronics LTD, Harpenden Herts, Großbritannien) ermittelt, und ein korrespondierender Blutaussstrich wurde nach Pappenheim gefärbt. Die absolute Anzahl der Leukozytensubpopulationen wurde durch Multiplikation der aus dem Differentialblutbild erhaltenen Prozentzahl mit der Gesamtleukozytenzahl ermittelt. Zur Beurteilung der Blutaussstriche wurden diese kodiert; somit war dem Beurteiler die verwendete Dosis des G-CSF unbekannt.

3.4.2. Experimentelle Pneumonie und Versuchsprotokolle

Die einzelnen Versuchsreihen sind in ihrem zeitlichen Ablauf in Tabelle 1 (siehe Seite 16) dargestellt. Die Erzeugung einer bakteriellen Pneumonie wurde wie beschrieben durchgeführt {3795}{4160}. Dafür wurden die Tiere mit intraperitoneal verabreichtem Xylacin (8 mg/kg; Bayer, Leverkusen) und Ketamin (80 mg/kg; Parke, Davis & Co., München) anästhesiert. Das bakterielle Inokulum wurde in einem Volumen von 50 µl

verabreicht und enthielt 1×10^3 KBE. Dies geschah mittels einer Pipette in das linke Nasenloch der Tiere, die dabei mit dem Kopf nach oben gehalten wurden. Innerhalb von etwa 10 Minuten erwachten die Tiere nach kurzer Hyperventilation aus der Narkose. Das Überleben der Tiere wurde alle 12 Stunden für drei Tage registriert, das Gewicht einmal täglich. Falls ein Tier verstarb, wurde es obduziert. Nach 72 Stunden wurde der Versuch beendet und alle noch überlebenden Tiere mit CO₂ euthanasiert. Anschließend wurden Lunge, Leber und Milz entnommen und auf ihren Keimgehalt hin wie beschrieben untersucht {218}. Da die Teilung eines Organes zur simultanen Untersuchung auf Keimgehalt und histologische Veränderungen zu einem „sampling error“ führen kann, wurden die Tiere vor Versuchsbeginn für entweder eine histologische Aufarbeitung oder für die Untersuchung auf den Keimgehalt hin randomisiert. Starben vor Versuchsbeginn mehr als 50% der Tiere einer Gruppe (und wurden damit obduziert und histologisch untersucht), so wurden alle überlebenden Tiere für die Ermittlung des Keimgehaltes verwendet. Als Parameter für die systemische bakterielle Disseminierung aus dem Primärorgan (Lunge) wurde für jedes auf den Keimgehalt hin untersuchte Tier ein Index aus dem Keimgehalt der Leber oder der Milz und dem der Lunge gebildet:

$$\frac{\text{KBE in der Leber oder Milz}}{\text{KBE in der Lunge}}$$

Während der gesamten Dauer der Aufarbeitung wurden die Organhomogenate auf Eis gelagert. Von allen bis 72 Stunden nach Induktion der Pneumonie überlebenden Tieren wurden Blutaussstriche für Differentialblutbilder angefertigt. Eine Zählung der Leukozytenzahl war aus technischen Gründen nicht möglich. Zur Beurteilung der Blutaussstriche und der histologischen Präparate wurden diese kodiert; somit war dem Beurteiler die Behandlung nicht bekannt. Die histologischen Untersuchungen wurden in der Abteilung für Paidopathologie des Institutes für Pathologie der Humboldt-Universität durchgeführt (Leiter: Prof. Dr. M. Vogel).

Tabelle 1. Versuchsaufbau

Gruppen ^a	Zeit (h) ^b											
	-48	-36	-24	-12	0	6	12	24	36	48	60	
Kontrolltiere	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
G-CSF/p, 15 µg/kg/Gabe	G	G	G	G								
G-CSF/p, 50 µg/kg/Gabe	G	G	G	G								
G-CSF/p, 250 µg/kg/Gabe	G	G	G	G								
G-CSF/t, 50 µg/kg/Gabe								G	G	G	G	
mAb III/5-1 /p, 10 mg/kg einmalig						mAb						
mAb III/5-1 /t, 10 mg/kg einmalig								mAb				
G-CSF/p, 50 µg/kg/Gabe + mAb III/5-1 /p, 10 mg/kg einmalig	G	G	G	G	mAb							
Pentoxifyllin/t, 50 mg/kg/Gabe					P	P	P					
G-CSF/p, 50 µg/kg/Gabe + Pentoxifyllin/t, 50 mg/kg/Gabe	G	G	G	G	P	P	P					

^a p = Behandlung vor Induktion der Pneumonie (prophylaktisch); t = Behandlung nach Induktion der Pneumonie (therapeutisch). Die Kontrolltiere erhielten jeweils PBS zu den angegebenen Zeitpunkten entsprechend der Verabreichung der jeweiligen Reagenzien (s.c., i.v. oder i.p.).

^b Angegeben ist der Zeitpunkt vor beziehungsweise nach Induktion der Pneumonie (Stunde 0).

3.5. Immunoblotting

K. pneumoniae B5055 wurde in TSB bei 37°C und langsamer end-über-end-Rotation über Nacht angezüchtet. Nach Zentrifugation (1560 x g, 15 Minuten, 4°C) wurde das bakterielle Sediment in TRIS/EDTA-Puffer lysiert (50 mmol/l TRIS, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid, 100 µg/ml Aprotinin, 0,1 mmol/l Leupeptin; pH 8,0). Dies geschah durch drei Zyklen Einfrieren/Auftauen. Anschließend wurde das Lysat für 10 Minuten mit 0,5% SDS und 1,25% Mercaptoethanol inkubiert und mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das aufgetrennte Material wurde auf eine PVDF-Membran (Millipore, Bedford, USA) mittels Elektrotransfer semi-trockengeblottet (15 V, 40 Minuten; BioRad, Hercules, USA). Nach dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit Füllpuffer {106} wurden die einzelnen Bahnen mittels eines Hoefer Decafold-Apparates (Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) separat mit G-CSF bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach gründlichem Waschen in PBS wurde gebundenes G-CSF mit einem murinen monoklonalen Antikörper gegen humanes G-CSF markiert (4°C, 4 Stunden). Um unspezifische Bindungen des Antikörpers abzusättigen, wurde er vor der Inkubation mit bakteriellem Lysat präabsorbiert (37°C, 1 Stunde). Gebundener Antikörper wurde anschließend mit einem mit horseradish Peroxidase-markiertem anti-Maus-IgG detektiert (4°C, 4 Stunden) und der Blot anschließend mit enhanced chemiluminescence entwickelt. Identische Zweitgele wurden für eine Silberfärbung herangezogen {3017}. Als Positivkontrolle wurde G-CSF ebenfalls der Elektrophorese unterworfen. Als Negativkontrollen dienten eine Inkubation mit IL-1 α (Genzyme, Cambridge, MA, USA) anstelle von G-CSF sowie die Präabsorption des G-CSF mit einem polyklonalen, gegen G-CSF gerichteten Kaninchenserum vor Inkubation des Blots. Der monoklonale Antikörper gegen G-CSF sowie das polyklonale Kaninchenserum wurden freundlicherweise von Dr. P. Stevens und Ed Shatzen, AMGEN, Thousand Oaks, USA, zur Verfügung gestellt. Zur genaueren Untersuchung von Bindungsstellen wurde ein Teil des bakteriellen Lysates vor Elektrophorese mit Proteinase K verdaut (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA). Diese und die nachfolgenden Untersuchungen erfolgten im Labor von Dr. A.S. Cross, Greenebaum Cancer Center, University of Maryland, Baltimore, USA.

3.6. Bindung von $^{125}\text{J-G-CSF}$ an *K. pneumoniae*

G-CSF wurde nach der Chloramin-T-Methode mit radioaktivem Jod (^{125}J) markiert {4252} {4253}. Einzelkolonie-Isolate von *K. pneumoniae* B5055 oder F201 wurden in TSB bei 37°C über 4 Stunden angezüchtet. 1×10^8 KBE wurden in 0,5 ml PBS zusammen mit 1% hitzeinaktiviertem Rinderserum und verschiedenen Konzentrationen von $^{125}\text{J-G-CSF}$ inkubiert. Vorversuche ergaben keine Änderung des Bindungsverhaltens bei 37°C gegenüber der Inkubation bei 4°C oder bei Hinzufügen beziehungsweise Weglassen von Natriumazid. Daher wurden die Experimente bei 4°C ohne Natriumazid unter langsamer end-über-end-Rotation durchgeführt. Nach 40 Minuten wurden die Proben zentrifugiert (5 Minuten bei $14250 \times g$) und der Überstand sofort abgetrennt. Die Radioaktivität in Überstand und Sediment wurde in einem Gamma-Counter gemessen. Um die Spezifität der Bindung von G-CSF an die Bakterien zu ermitteln, wurden einige Proben zusätzlich mit unmarkiertem G-CSF oder mit unmarkiertem IL-1 α inkubiert. Die gebundene Menge an $^{125}\text{J-G-CSF}$ wurde in molare Konzentrationen wie vorbeschrieben umgewandelt {3512}.

3.7. In vitro-Produktion von KPS in der Gegenwart von G-CSF

Nach Inkubation einer Starterkultur von *K. pneumoniae* B5055 oder F201 in Trypticase-Soja-Bouillon (TSB) (37°C, über Nacht) wurden 2×10^5 KBE in 250 ml frische TSB überführt und in der Gegenwart von G-CSF (10 ng/ml), IL-1 α (2 ng/ml) oder Diluent (PBS) erneut bei 37°C und langsamer Rotation (120 rpm) inkubiert. Nach 2, 4, 6, 8 und 10 Stunden wurden jeweils 50 ml abgenommen und sofort auf Eis gestellt. Die Proben wurden hinsichtlich der Keimzahl und des zellgebundenen KPS wie vorbeschrieben untersucht {2008} {106} {218}.

3.8. Mikrophagozytose-Assay

3.8.1. Präparation der Granulozyten und des Serums

50 ml venöses Blut wurde einem gesunden Spender entnommen und heparinisiert (50 U/ml). Um Variationen zwischen den einzelnen Ansätzen so gering wie möglich zu halten, wurde nur ein einziger Spender für alle Versuche herangezogen. Die Isolierung der Granulozyten wurde wie beschrieben durchgeführt; eventuell vorhandene Antikör-

per gegen *K. pneumoniae* wurden durch die Waschprozesse entfernt {3055}. Als Komplementquelle diente das Serum eines anderen gesunden Spenders, das keine Antikörper gegen *K. pneumoniae* enthielt {3055}. Es wurde in Aliquots bei -80°C gelagert und in allen Experimenten in einer Endkonzentration von 60 Vol.% eingesetzt.

3.8.2. Mikrophagozytose-Assay

Granulozyten wurden in einer Rundboden-Mikrotiterplatte (Costar, Cambridge, MA, USA) in einer Endkonzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung mit Serum, Hank's Balanced Salt Solution mit Ca^{2+} und Mg^{2+} und Bakterien in einer Endkonzentration von $2,5 \times 10^4$ KBE pro well in einem Gesamtvolumen von 150 µl inkubiert. Die Bakterien wurden vorher wie unter 3.2. beschrieben in der Gegenwart oder Abwesenheit von G-CSF für 6 Stunden angezüchtet. Um einen Effekt des im Anzuchtmedium vorhandenen G-CSF auf den nachfolgenden Mikrophagozytose-Assay auszuschließen, wurden die Bakterien vor dem Einsatz im Assay gründlich mehrmals gewaschen (siehe 3.2). Die Inkubation im eigentlichen Mikrophagozytose-Assay erfolgte bei 37°C und einer Rotation von 1000 rpm, um einen möglichst engen Kontakt zwischen Granulozyten und Bakterien zu gewährleisten. Zum Zeitpunkt 0 und nach 60 und 90 Minuten wurden 10 µl von jeder Vertiefung entnommen, in steriles Wasser mit 0,1% BSA überführt und auf Eis gestellt, um die Granulozyten ohne Abtöten der Bakterien zu lysieren. Die Bakterienzahl wurde anschließend durch Ausplattieren 10-facher Verdünnungen auf TSA ermittelt. Der Prozentsatz überlebender Bakterien wurde wie folgt ermittelt:

$$[(1 - \text{KBE bei 60 oder 90 Minuten}) \div \text{KBE bei 0 Minuten}] \times 100$$

Jedes Experiment wurde im Doppelansatz durchgeführt. Als Kontrollen dienten die Inkubation von Bakterien und Granulozyten ohne Serum, von Bakterien und Serum ohne Granulozyten sowie von Bakterien, Granulozyten und hitzeinaktiviertem Serum (56°C, 30 Minuten), um unspezifische antibakterielle Aktivität des Serums oder gegen KPS gerichtete Antikörper auszuschließen.

Um zu ermitteln, ob die antibakterielle Aktivität der Granulozyten auf Phagozytose beruht, wurde der Assay erneut angesetzt. Nach 60 Minuten wurden Proben (10 µl) ent-

nommen und die Mikrotiterplatten wurden sofort danach zentrifugiert (250 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur), um Granulozyten von nicht phagozytierten Bakterien abzutrennen. Anschließend wurden aus dem Überstand erneut Proben (10 µl) entnommen und wie oben beschrieben die KBE bestimmt.

3.9. Statistische Analyse

Die Signifikanz der Letalität wurde mittels des Cox-Mantel-Testes untersucht; für alle anderen Parameter wurde der zweiseitige Mann-Whitney U-Test verwendet. Alle Berechnungen wurden mittels der Software „Statistica for Windows, Version 4.5“ (Statsoft, Tulsa, USA) durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden P-Werte $< 0,05$ angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Effekt des rekombinanten humanen G-CSF im verwendeten Mausstamm

Um eine Beeinflussung der Leukozytenzahlen durch häufige Blutabnahme auszuschließen, wurde bei den Tieren vier Tage vor erster G-CSF-Gabe mit einmal täglicher Blutabnahme begonnen. Dabei zeigte sich, daß dadurch Zahl und Zusammensetzung der Leukozyten im peripheren Blut unverändert blieben (Abbildungen 1 und 2). Dosisabhängig konnte nach Gabe von G-CSF sowohl ein Anstieg der Gesamtleukozyten (Abb. 1) als auch ein Anstieg der absoluten Anzahl neutrophiler Granulozyten beobachtet werden (Abb. 2). Dabei wiesen die Veränderungen bei den Dosierungen von 2 x 15 µg/kg G-CSF/die und 2 x 50 µg/kg G-CSF/die ihr Maximum am zweiten Tag nach Beginn der Gabe auf. Bei einer Dosierung von 2 x 250 µg/kg G-CSF/die wurde das Maximum der Veränderungen am dritten Tag nach Start der Verabreichung beobachtet. Da die Angaben über Normalwerte von Leukozyten zwischen verschiedenen Mausstämmen und – innerhalb eines Stammes – bei verschiedenen Untersuchern stark schwanken {4245} {4246}, wurden die für die hier verwendeten BALB/c-Mäuse ermittelten Normalwerte für Gesamtleukozyten und für neutrophile Granulozyten aus den von Tag –4 bis einschließlich Tag 0 (vor der ersten G-CSF-Gabe) gemessenen Werten ermittelt.

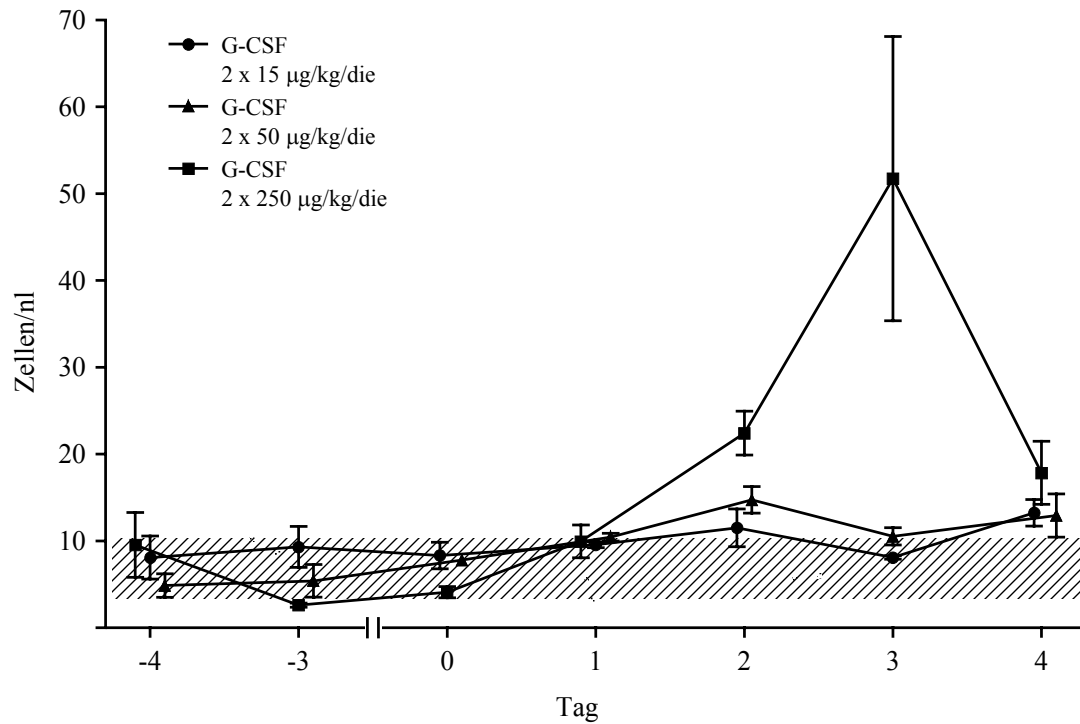


Abbildung 1: Dosisabhängige Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl durch G-CSF, gegeben ab Tag 0, in BALB/c-Mäusen ($n = 3$ Tiere/Gruppe). Angegeben sind Mittelwert \pm SEM. Der für diesen Mausstamm ermittelte Normalbereich für Gesamtleukozyten (Mittelwert $\pm 1 \times$ SD) ist schraffiert unterlegt.

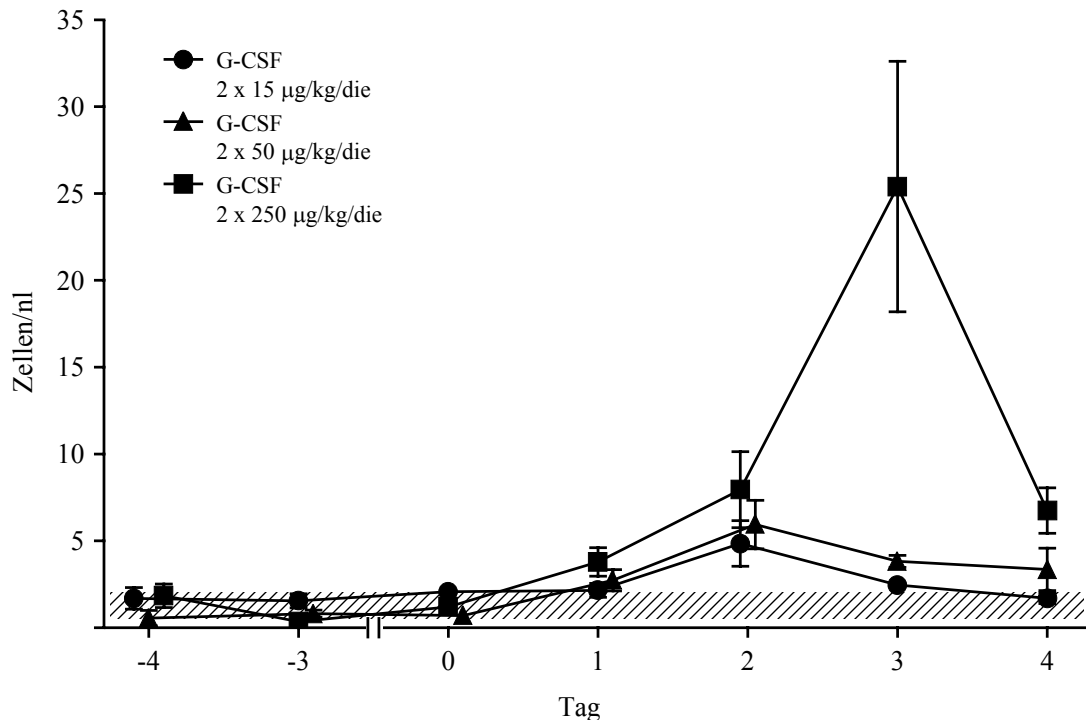


Abbildung 2: Dosisabhängige Erhöhung der neutrophilen Granulozyten durch G-CSF, gegeben ab Tag 0, in BALB/c-Mäusen (n = 3 Tiere/Gruppe). Angegeben sind Mittelwert \pm SEM. Der für diesen Mausstamm ermittelte Normalbereich für neutrophile Granulozyten ist schraffiert unterlegt.

4.2. Einfluß von G-CSF auf die experimentelle *K. pneumoniae*-Pneumonie

4.2.1. Überleben

Um die Auswirkungen einer Behandlung mit G-CSF auf die experimentelle *K. pneumoniae*-Pneumonie zu untersuchen, wurde den Tieren entweder vor oder nach Induktion der Pneumonie zweimal täglich G-CSF in verschiedenen Dosierungen subkutan verabreicht (Tabelle 1, Seite 16). Während der ersten 36 Stunden nach Induktion der Pneumonie überlebten alle untersuchten Tiere. Danach hingegen war eine Letalität vor allem der mit G-CSF behandelten Tiere zu verzeichnen. Diese war am stärksten in der Gruppe ausgeprägt, die mit 2 x 50 µg/kg ab Tag -2 behandelt wurde (Abb. 3). Die beiden anderen Dosierungen von G-CSF bei prophylaktischer Gabe (2 x 15 µg/kg und 2 x 250 µg/kg ab Tag -2) sowie die Verabreichung von 2 x 50 µg/kg G-CSF ab Tag +1 nach Induktion der Pneumonie führten zwar auch zu einer höheren Letalität im Vergleich zur

unbehandelten Kontrollgruppe, jedoch war dies nicht statistisch signifikant. Durch G-CSF von Tag –2 bis Tag 0 verstarb kein Tier.

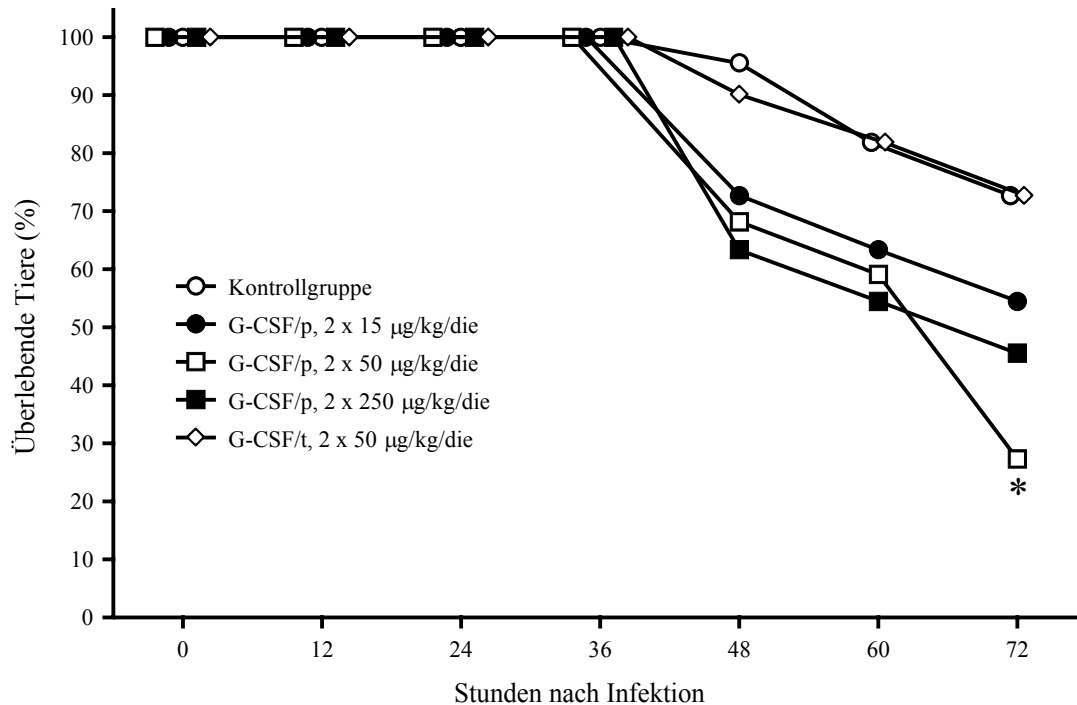


Abbildung 3. Überlebenskurven bei experimenteller *K. pneumoniae*-Pneumonie unter dem Einfluß von G-CSF (n = 11 Tiere/Gruppe). G-CSF/p: prophylaktische Gabe von G-CSF; G-CSF/t: therapeutische Gabe von G-CSF (vergleiche Tabelle 1, Seite 16). *: P = 0,011 im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe, die G-CSF therapeutisch erhielt (G-CSF/t).

4.2.2. Klinischer Verlauf

Um Informationen nicht nur über Letalität, sondern auch über den klinischen Verlauf bis zum Ende des Versuchs 72 Stunden nach Induktion der Pneumonie bei den Tieren zu erhalten, die nicht verstarben, wurde täglich das Gewicht gemessen, da dieser Parameter eng mit dem Schweregrad einer experimentell induzierten bakteriellen Pneumonie korreliert [218] [4160]. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Gewichtsverhalten durch die prophylaktische oder therapeutische Gabe von G-CSF beobachtet werden. Dies war von der Dosierung des Wachstumsfaktors unabhängig (Abb. 4).

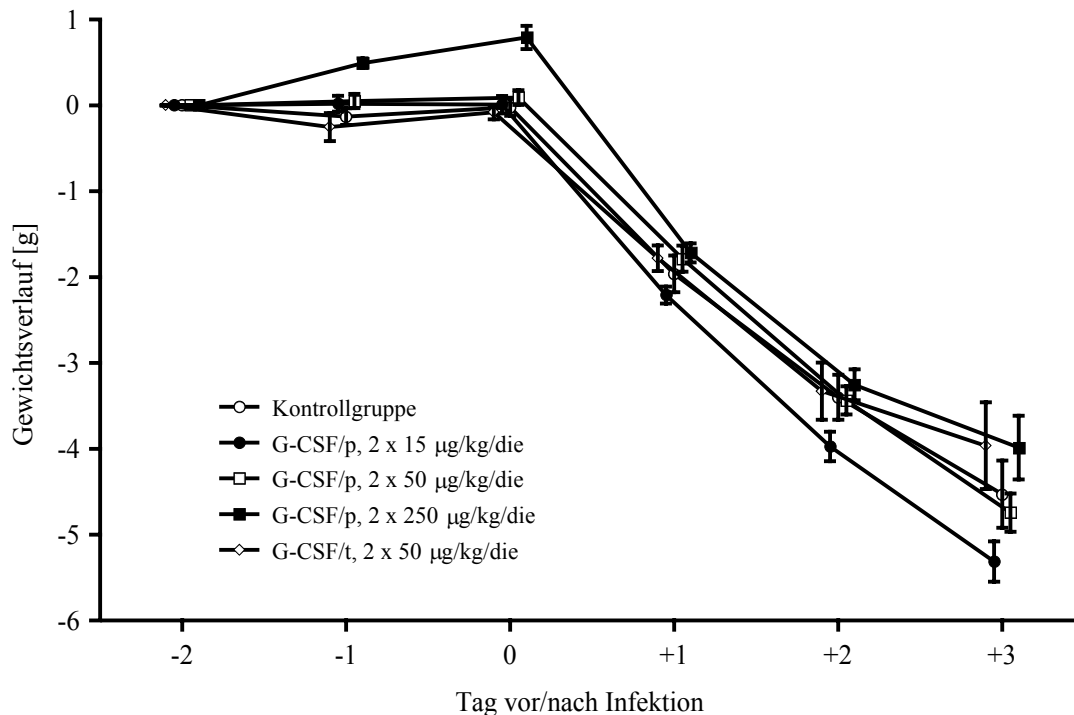


Abbildung 4. Gewichtsverlauf bei experimenteller *K. pneumoniae*-Pneumonie unter dem Einfluß von G-CSF (n = 11 Tiere/Gruppe). Angegeben sind Mittelwert \pm SEM. G-CSF/p: prophylaktische Gabe von G-CSF; G-CSF/t: therapeutische Gabe von G-CSF (vergleiche Tabelle 1, Seite 16).

4.2.3. Quantitative Bestimmung der Keimzahlen

Bei einer prophylaktischen Gabe von 2 x 15 µg/kg hatte G-CSF eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Erhöhung der Keimzahlen in Leber und Milz zur Folge (Abb. 5). Bei höherer Dosierung war hingegen eine Abnahme der Keimzahlen in der Lunge zu beobachten, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 5). Überraschend jedoch fand sich eine Umkehrung des quantitativen Keimverhältnisses zwischen dem primär infizierten Organ (Lunge) und den sekundär besiedelten Organen Leber und Milz im Vergleich zur Kontrollgruppe. War dort die Reihenfolge Lunge \rightarrow Leber \rightarrow Milz zu beobachten (absteigend nach KBE geordnet), so kehrte sich dies bei den mit 2 x 50 µg/kg und 2 x 250 µg/kg G-CSF prophylaktisch behandelten Tieren um. Nun fand sich die höchste Anzahl an KBE in der Leber, und der Gehalt an Bakterien in der Milz war ebenso hoch (bei 2 x 50 µg/kg G-CSF) oder höher (bei 2 x 250 µg/kg G-CSF) als der der Lunge (Abb. 5). Die therapeutische Gabe von G-CSF zeigte keinen signifikanten Einfluß auf den Keimgehalt in Lunge, Leber oder Milz (Abb. 5).

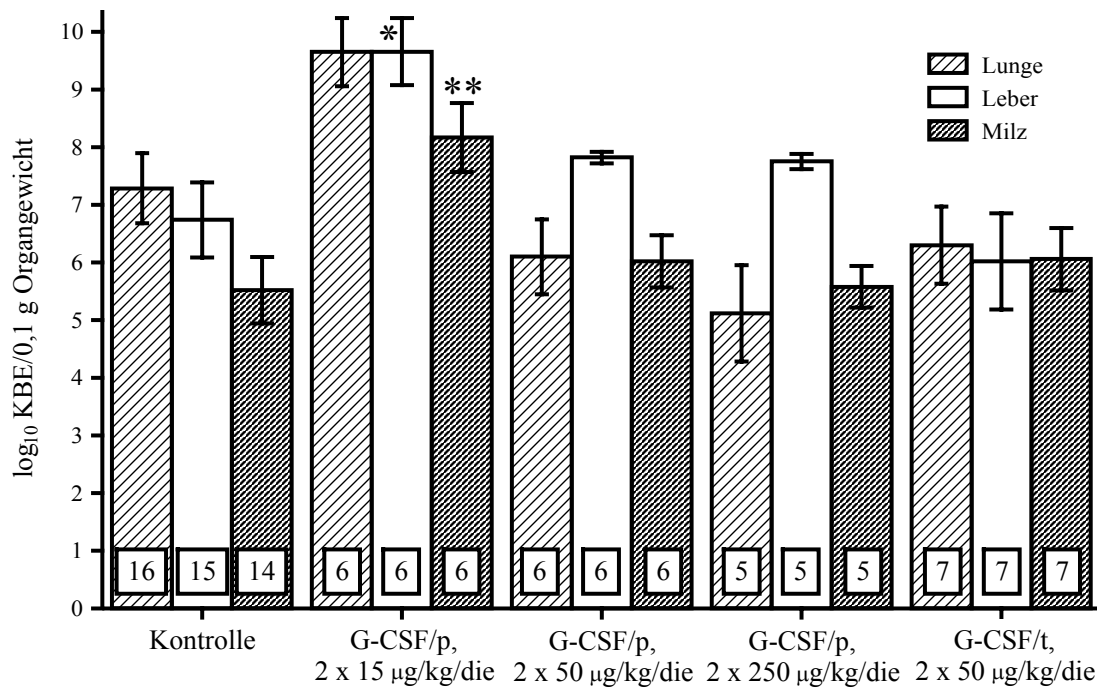


Abbildung 5: Keimgehalt in Lunge, Leber und Milz bei experimenteller *K. pneumoniae*-Pneumonie unter dem Einfluß von G-CSF. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM. Innerhalb der Säulen ist die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben. G-CSF/p: prophylaktische Gabe von G-CSF; G-CSF/t: therapeutische Gabe von G-CSF (vergleiche Tabelle 1, Seite 16). *: $P = 0,005$ und **: $P = 0,014$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Um dieses Verhalten statistisch näher zu charakterisieren, wurde ein Index aus dem Keimgehalt in Leber oder Milz, dividiert durch den Keimgehalt in der Lunge, gebildet. Diese Indices waren dosisabhängig umso höher, je mehr G-CSF prophylaktisch verabreicht wurde (Tabelle 2).

Tabelle 2. Indices der Keimzahlen aus Leber/Milz und Lunge als Parameter für die bakterielle Disseminierung.

Behandlung ^a	KBE Leber	KBE Milz	Signifikanz- niveau ^c
	KBE Lunge	KBE Lunge	
Kontrolltiere	0,931 ± 0,072 ^b	0,751 ± 0,037	
G-CSF/p, 15 µg/kg/Gabe	1,001 ± 0,008	0,847 ± 0,035	0,043 (L)*
G-CSF/p, 50 µg/kg/Gabe	1,405 ± 0,232	1,029 ± 0,086	0,012 (L)* 0,006 (M)*
G-CSF/p, 250 µg/kg/Gabe	1,686 ± 0,265	1,163 ± 0,116	0,008 (L)* 0,006 (M)*
G-CSF/t, 50 µg/kg/Gabe	0,945 ± 0,105	1,001 ± 0,098	0,015 (M)*
MAb III/5-1 /p, 10 mg/kg einmalig	0,636 ± 0,084	0,525 ± 0,071	0,02 (L)* 0,01 (M)*
MAb III/5-1 /t, 10 mg/kg einmalig	0,439 ± 0,037	0,407 ± 0,021	0,0002 (L)* 0,0001 (M)*
G-CSF/p, 50 µg/kg/Gabe + MAb III/5-1 /p, 10 mg/kg einmalig	0,690 ± 0,120	0,502 ± 0,062	0,013 (M)* 0,007 (L)** 0,002 (M)**
Pentoxifyllin/t, 50 mg/kg/Gabe	0,988 ± 0,096	0,870 ± 0,023	
G-CSF/p, 50 µg/kg/Gabe + Pentoxifyllin/t, 50 mg/kg/Gabe	0,943 ± 0,031	0,752 ± 0,044	

^a p = Behandlung vor Induktion der Pneumonie (prophylaktisch); t = Behandlung nach Induktion der Pneumonie (therapeutisch). Die Kontrolltiere erhielten jeweils PBS entsprechend der Verabreichung der jeweiligen Reagenzien (s.c., i.v. oder i.p.). Der genaue Behandlungsplan ist in Tabelle 1 (Seite 16) angegeben.

^b Angegeben sind Mittelwert ± SEM.

^c (L): Signifikanzniveau für den Index KBE Leber ÷ KBE Lunge; (M): Signifikanzniveau für den Index KBE Milz ÷ KBE Lunge; *: P im Vergleich zu den Kontrolltieren; **: P im Vergleich zu den Tieren, die nur G-CSF prophylaktisch mit 50 µg/kg/Gabe erhielten.

4.2.4. Histologische Befunde

In der Lunge war bei den Kontrolltieren eine eitrig abszedierende Pneumonie zu finden (Abb. 6 A, Seite 90). In der Leber hingegen zeigten sich nur wenige Gruppennekrosen mit histiozytärer Abraumreaktion (Abb. 6 B, Seite 90). Die mit G-CSF behandelten Tiere wiesen in der Lunge gering ausgeprägte Herdpneumonien, zum Teil eitrig abszedierend und nekrotisierend auf (Abb. 6 C, Seite 90). In der Leber fanden sich im Gegensatz zu den Kontrolltieren ausgedehnte, zum Teil landkartenartig konfigurierte Gruppennekrosen und Abszesse, die mit dichten Bakterienrasen beladen waren (Abb. 6 D, Seite 90). Zum Teil fanden sich granulozytäre Abraumreaktionen am Rand dieser Abszesse. Die pulmonalen Veränderungen bei G-CSF-Gabe waren von der Dosierung unabhängig. Bei Gabe von G-CSF nach Induktion der Pneumonie waren die pulmonalen Veränderungen nicht so stark ausgeprägt wie bei den Kontrolltieren (Abb. 6 E, Seite 91). Im Vergleich zu den Kontrolltieren kam es zwar zu ausgedehnten Abszessen in der Leber und der Milz mit massiven Bakterienrasen (Abbildungen 6 F, G und H, Seite 91). Jedoch waren im Gegensatz zu den Tieren, die G-CSF vor Induktion der Pneumonie erhielten, keine Gruppennekrosen in der Leber zu beobachten (Abbildungen 6 F und D, Seite 90 f.).

4.3. Einfluß des gegen K2-Kapselpolysaccharid gerichteten monoklonalen Antikörpers mAb III/5-1 auf die experimentelle *K. pneumoniae*-Pneumonie

4.3.1. Überleben

In den Gruppen, die den monoklonalen Antikörper III/5-1 erhielten, überlebten alle Tiere bis zum Ende der Experimente (Abb. 7), unabhängig davon, ob der mAb III/5-1 prophylaktisch (d.h., eine Stunde vor Infektion) oder therapeutisch (24 Stunden nach Infektion) gegeben wurde. Bei der prophylaktischen Kombinationsbehandlung der Infektion mit mAb III/5-1 und G-CSF (2 x 50 µg/kg) konnte die signifikante Erhöhung der Letalität durch G-CSF alleine verhindert werden (Abbildungen 3 und 7).

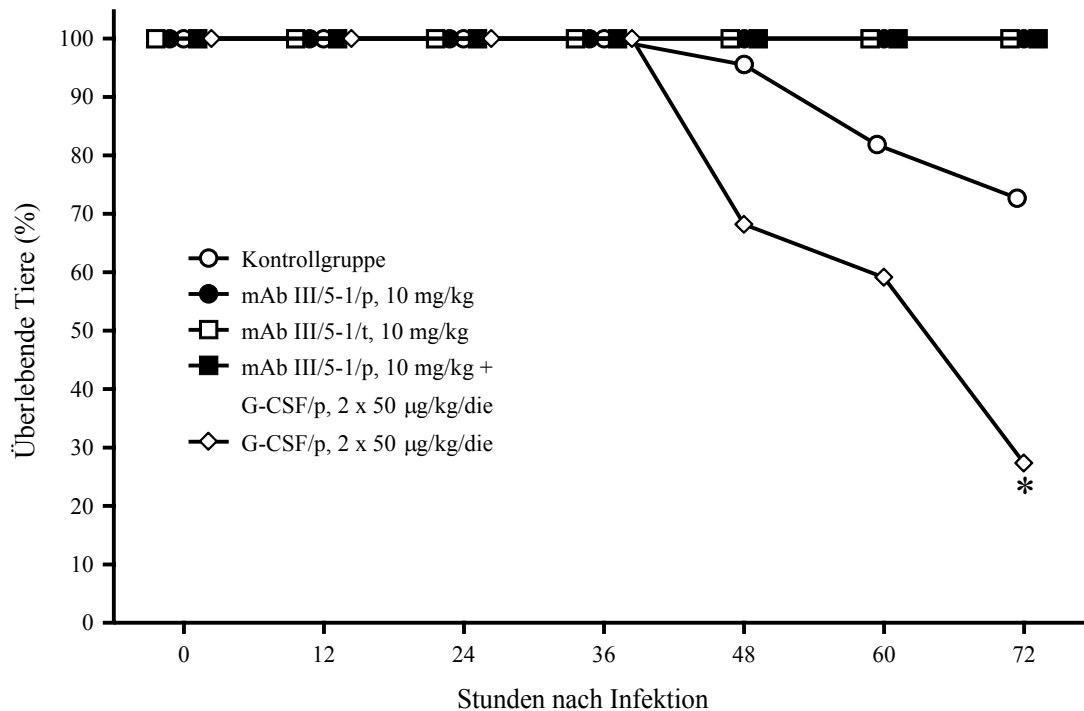


Abbildung 7: Überlebenskurven bei experimenteller *K. pneumoniae*-Pneumonie unter dem Einfluß des spezifisch gegen K2-KPS von *K. pneumoniae* gerichteten mAb III/5-1 und Synergismus dieser Therapie mit der Gabe von G-CSF (n = 11 Tiere/Gruppe). mAb III/5-1/p: prophylaktische Gabe des mAb; mAb III/5-1/t: therapeutische Gabe des mAb; G-CSF/p: prophylaktische Gabe von G-CSF (vergleiche Tabelle 1, Seite 16). *: P = 0,011 im Vergleich zur Kontrollgruppe und P = 0,0094 zur Gruppe, die sowohl G-CSF prophylaktisch als auch den mAb III/5-1 prophylaktisch erhielt.

4.3.2. Klinischer Verlauf

Im Gegensatz zu der Behandlung mit G-CSF konnte die Therapie mit dem mAb III/5-1 den klinischen Verlauf nachhaltig zum besseren beeinflussen. Es zeigte sich, korrespondierend zur Letalität unabhängig von prophylaktischer oder therapeutischer Gabe des Antikörpers, ein signifikant geringerer Gewichtsverlust im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Abb. 8). Ebenfalls korrespondierend zur Letalität ließ sich eine signifikante Verbesserung des klinischen Verlaufes durch die Kombinationsbehandlung mit mAb III/5-1 und G-CSF (2 x 50 mg/kg/die) im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren und zu den Tieren, die nur G-CSF erhielten, beobachten (Abbildungen 4 und 8).

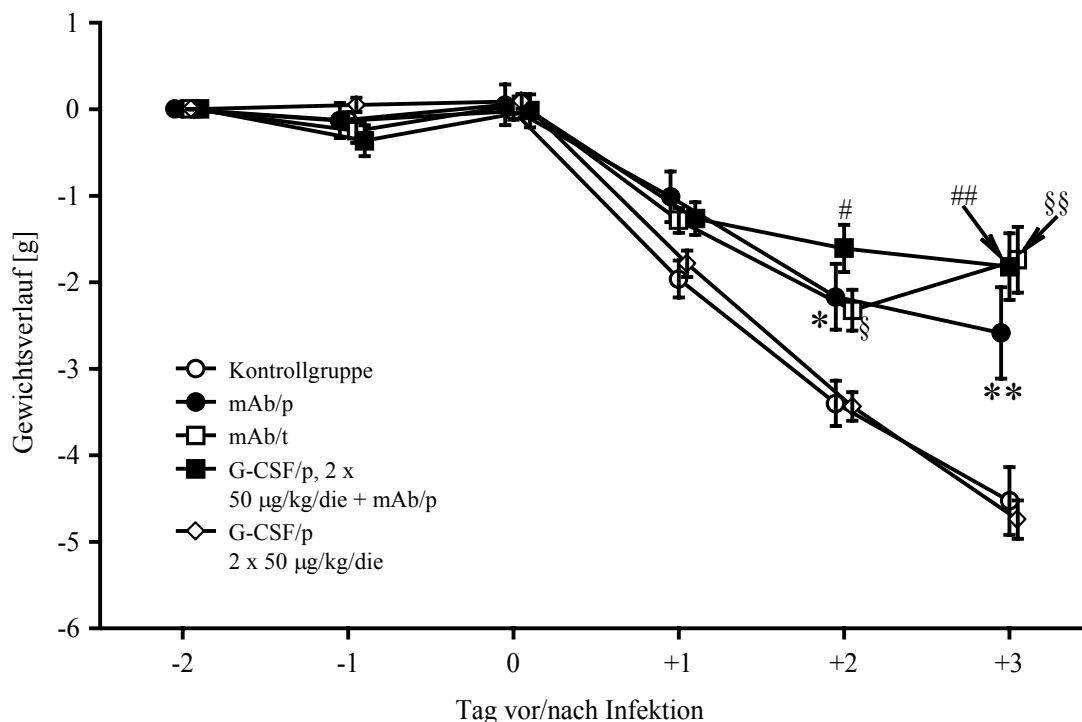
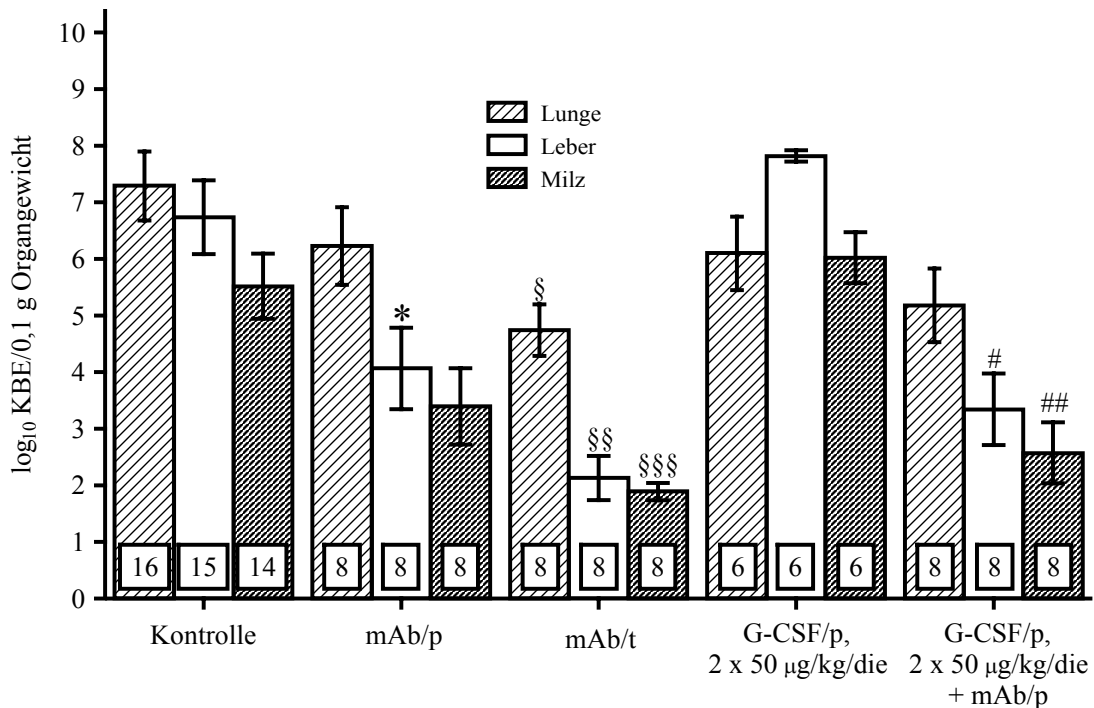


Abbildung 8: Gewichtsverlauf bei experimenteller *K. pneumoniae*-Pneumonie unter dem Einfluß des spezifisch gegen K2-KPS von *K. pneumoniae* gerichteten mAb III/5-1 und Synergismus dieser Therapie mit der Gabe von G-CSF (n = 11 Tiere/Gruppe). Angegeben sind Mittelwert \pm SEM. mAb III/5-1/p: prophylaktische Gabe des mAb; mAb III/5-1/t: therapeutische Gabe des mAb; G-CSF/p: prophylaktische Gabe von G-CSF (vergleiche Tabelle 1, Seite 16). *: P = 0,014 und **: P = 0,007 im Vergleich zur Kontrollgruppe. §: P = 0,003 und §§: P = 0,0001 im Vergleich zur Kontrollgruppe. #: P = 0,0001 im Vergleich zur Kontrollgruppe und P = 0,00001 im Vergleich zur Gruppe, die G-CSF prophylaktisch erhielt (G-CSF/p). ##: P = 0,0001 im Vergleich zur Kontrollgruppe und P = 0,00001 im Vergleich zur Gruppe, die G-CSF prophylaktisch erhielt (G-CSF/p).

4.3.3. Quantitative Bestimmung der Keimzahlen

Im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren konnte durch die Behandlung mit mAb III/5-1 in den primär infizierten Organen, den Lungen, keine statistisch signifikante Abnahme der Keimzahlen erreicht werden. Dies war jedoch der Fall bei den septisch besiedelten Organen Leber und Milz (Abb. 9). Dabei zeigte sich, daß die therapeutische

Gabe des mAb der prophylaktischen überlegen war (Abb. 9). Im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu den allein mit G-CSF prophylaktisch behandelten Tieren (2 x 50 µg/kg/die) hatte die gleichzeitige Behandlung der experimentellen Pneumonie mit mAb III/5-1 und G-CSF eine signifikante Verringerung des Keimgehaltes in Leber und Milz zur Folge. Die mit alleiniger G-CSF-Gabe entschieden geförderte septische Ausbreitung der Infektion in Leber und Milz (vgl. Abb. 5) konnte durch simultane Gabe des mAb



III/5-1 verhindert werden (Abb. 9). Dies schlug sich auch in den Indices aus KBE in Leber oder Milz/KBE in der Lunge nieder (Tabelle 2).

Abbildung 9: Keimgehalt in Lunge, Leber und Milz bei experimenteller *K. pneumoniae*-Pneumonie unter dem Einfluß des spezifisch gegen K2-KPS von *K. pneumoniae* gerichteten mAb III/5-1 und Synergismus dieser Therapie mit der Gabe von G-CSF. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM. Innerhalb der Säulen ist die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben. mAb III/5-1/p: prophylaktische Gabe des mAb; mAb III/5-1/t: therapeutische Gabe des mAb; G-CSF/p: prophylaktische Gabe von G-CSF (vergleiche Tabelle 1, Seite 16). *: $P = 0,016$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. §: $P = 0,011$; §§: $P = 0,0003$ und §§§: $P = 0,0001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. #: $P = 0,005$ im Vergleich zur Kontrollgruppe und $P = 0,0007$ im Vergleich zur Gruppe, die G-CSF pro-

phylaktisch erhielt (G-CSF/p). ##: $P = 0,004$ im Vergleich zur Kontrollgruppe und $P = 0,008$ im Vergleich zur Gruppe, die G-CSF prophylaktisch erhielt (G-CSF/p).

4.3.4. Histologische Befunde

Die allein mit dem mAb III/5-1 behandelten Tiere wiesen eine im Vergleich zu den Kontrolltieren geringer ausgeprägte pneumonische Alteration der Lunge auf (Abb. 10 A, Seite 93). In der Leber fanden sich diskrete, einzelne Gruppenzellnekrosen mit Ab-räumreaktion und eine gering ausgeprägte Leberzellverfettung (Abb. 10 B, Seite 93). In Lunge und Leber waren die Veränderungen unabhängig von prophylaktischer oder therapeutischer Gabe des mAb III/5-1 gleich (Abbildungen 10 A und E sowie 10 B und F, Seite 93 f.). Die sowohl mit G-CSF als auch mit dem mAb III/5-1 behandelten Tiere hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu den allein mit G-CSF behandelten Tieren die am geringsten ausgebildeten entzündlichen Veränderungen in Lunge und Leber (Abbildungen 10 C und 10 D, Seite 93).

4.4. Einfluß von Pentoxifyllin auf die experimentelle *K. pneumoniae*-Pneumonie

Die bisher mit G-CSF erhobenen Befunde standen im Widerspruch zu den aus der Literatur bekannten. Die histologischen Befunde mit ausgedehnten Nekrosen in der Leber sowie mit Infiltration von neutrophilen Granulozyten in deren Randbereich ähnelten den in einer Arbeit von Suzuki et al. beschriebenen, die bei Patienten beobachtet wurden, deren Tumoren G-CSF produzierten {2190}. Zusätzlich bestand die Möglichkeit, daß diese Nekrosen durch eine Überproduktion von $\text{TNF-}\alpha$ hervorgerufen wurden {4173} {4172}. Da eine überschießende Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ auch die erhöhte Letalität erklären könnte, wurden Experimente durchgeführt, in denen die Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ blockiert wurde. Eine komplette Blockade von $\text{TNF-}\alpha$ aber, wie sie z.B. durch monoklonale Antikörper erreicht wird, hätte unter Umständen eine Erhöhung der Letalität zur Folge haben können, da bekannt ist, daß $\text{TNF-}\alpha$ für eine geordnete Infektabwehr notwendig ist {4240} {4242} {4182} {4194} {4180} {223} {2560}. Daher wurde Pentoxifyllin eingesetzt, da diese Substanz ein selektiver Inhibitor der Transkription von $\text{TNF-}\alpha$ mRNA ist {1698} {1707} und da weiterhin nachgewiesen wurde, daß Pentoxifyllin die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch GM-CSF nicht hemmt {1687}. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß Pentoxifyllin die endogene $\text{TNF-}\alpha$ -Antwort nicht komplett blockiert, sondern lediglich deren Ausmaß reduziert {1695}.

Um die durch alleinige prophylaktische Gabe von G-CSF ($2 \times 50 \mu\text{g/kg/die}$) erhöhte Letalität (vgl. 4.2.1.) nicht weiter zu erhöhen, sondern zu senken, wurde deshalb Pentoxifyllin ausgewählt.

4.4.1. Überleben

Bei der Verabreichung von Pentoxifyllin konnte beobachtet werden, daß die Gruppe, die Pentoxifyllin allein erhielt, zwar ebenfalls eine erhöhte Letalität im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwies, dies jedoch erst verzögert nach 60 Stunden (Abbildung 11). Die gleichzeitige Gabe von G-CSF ($2 \times 50 \mu\text{g/kg}$ ab Tag -2) und Pentoxifyllin ergab keinen Unterschied im Vergleich zur alleinigen Gabe von Pentoxifyllin hinsichtlich der Anzahl überlebender Tiere. Jedoch wurde durch den Zusatz von G-CSF die Kinetik der Letalität verändert; die Tiere begannen bereits ab 36 Stunden nach Induktion der Pneumonie zu versterben (Abbildung 11).

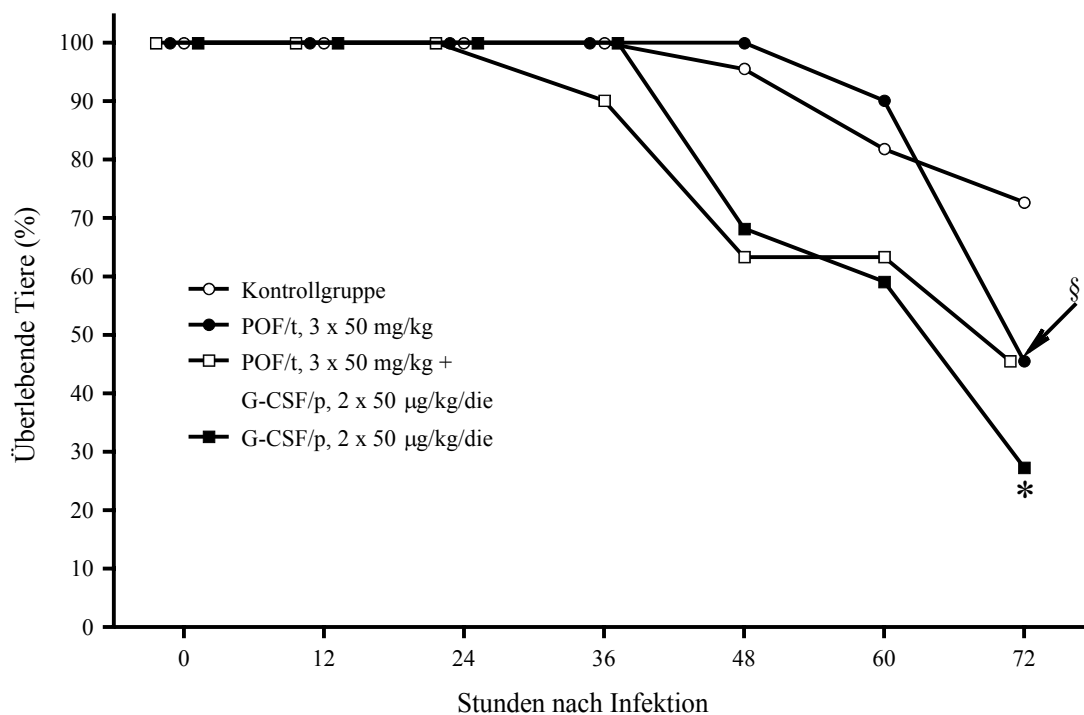


Abbildung 11. Überlebenskurven bei experimenteller *K. pneumoniae*-Pneumonie unter dem Einfluß von Pentoxifyllin (POF) und G-CSF ($n = 11$ Tiere/Gruppe). POF/t, therapeutische Gabe von Pentoxifyllin; G-CSF/p: prophylaktische Gabe von G-CSF (vergleiche Tabelle 1, Seite 16). *: $P = 0,011$ im Vergleich zur Kontrollgruppe; §: $P = 0,023$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.4.2. Klinischer Verlauf

Korrespondierend zur Letalität wies Pentoxifyllin keinen signifikanten Einfluß auf den klinischen Verlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, ebenso wie die gleichzeitige Gabe von G-CSF und Pentoxifyllin (Abb. 12).

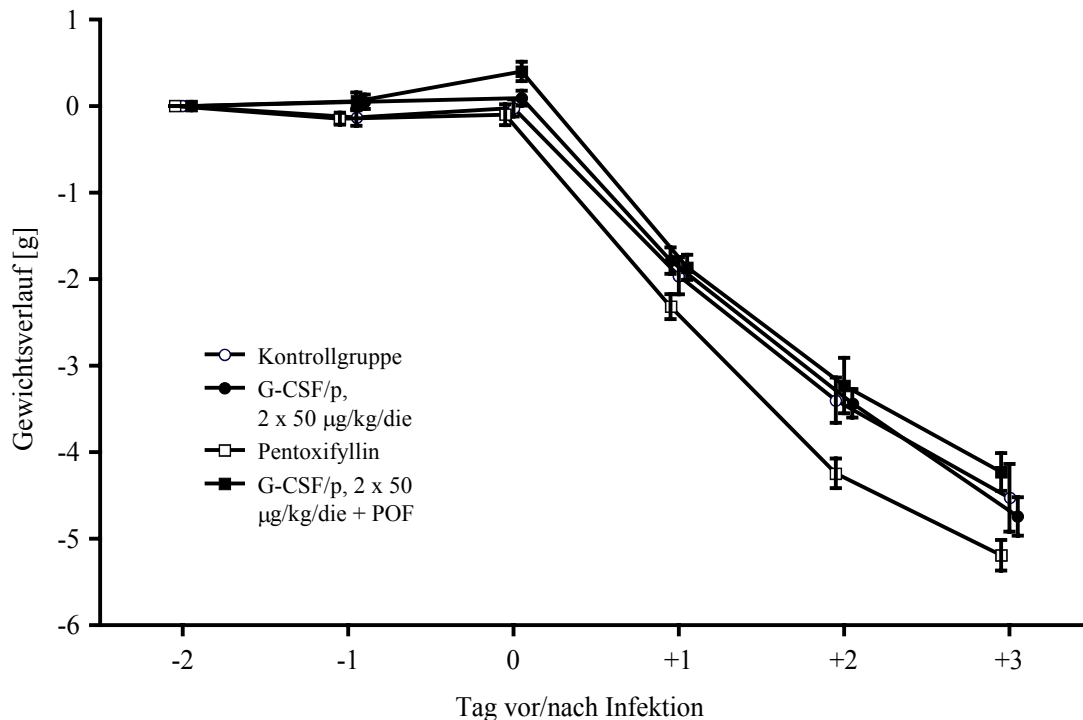


Abbildung 12. Gewichtsverlauf bei experimenteller *K. pneumoniae*-Pneumonie unter dem Einfluß von Pentoxifyllin und G-CSF (n = 11 Tiere/Gruppe). Angegeben sind Mittelwert \pm SEM. G-CSF/p: prophylaktische Gabe von G-CSF (vergleiche Tabelle 1, Seite 16).

4.4.3. Quantitative Bestimmung der Keimzahlen

Durch die Verabreichung von Pentoxifyllin alleine wurde der Keimgehalt in allen untersuchten Organen erhöht, in Leber und Milz auch statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 13). Die gleichzeitige prophylaktische Gabe von G-CSF (2 x 50 µg/kg/die) und Pentoxifyllin veränderte den Keimgehalt von Lunge, Leber und Milz nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Vergleich zur allein mit G-CSF (2 x 50 µg/kg/die) prophylaktisch behandelten Tieren konnte ein Keimgehalt der Leber, der den der Lunge übersteigt, bei beiden mit Pentoxifyllin behandelten Gruppen nicht nachgewiesen werden (Abb. 13).

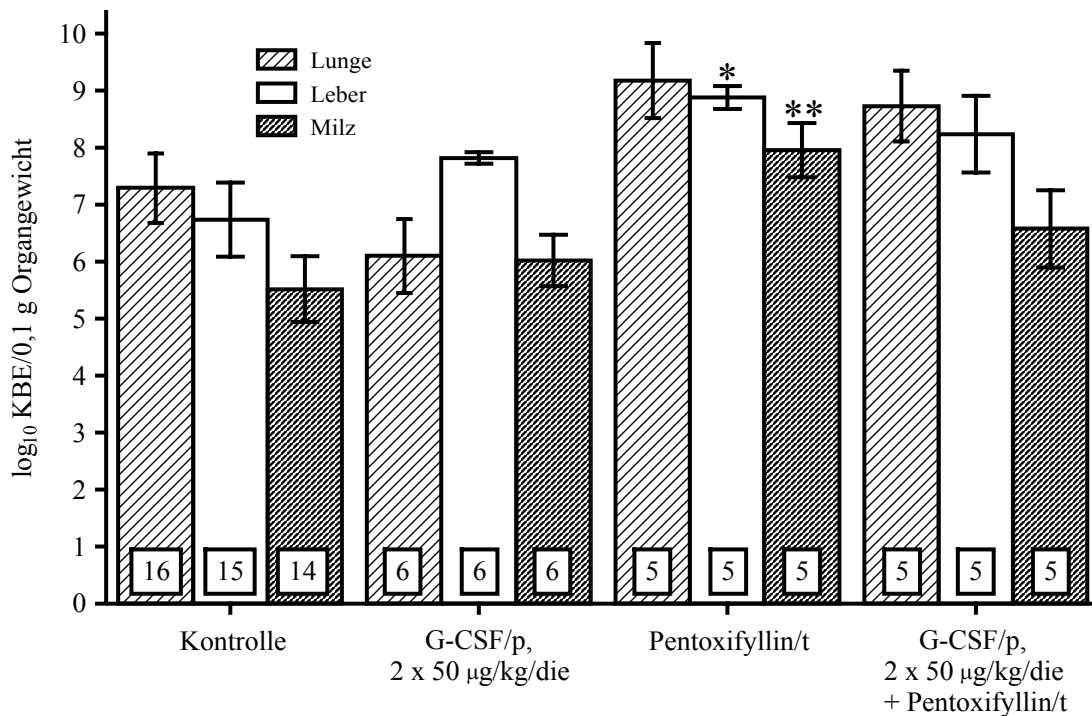


Abbildung 13: Keimgehalt in Lunge, Leber und Milz bei experimenteller *K. pneumoniae*-Pneumonie unter dem Einfluß von G-CSF und/oder Pentoxifyllin. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM. Innerhalb der Säulen ist die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben. Pentoxifyllin/t, therapeutische Gabe von Pentoxifyllin; G-CSF/p: prophylaktische Gabe von G-CSF (vergleiche Tabelle 1, Seite 16). *: $P = 0,036$ und **: $P = 0,028$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.4.4. Histologische Befunde

Die histologischen Veränderungen in der Lunge unter alleiniger Behandlung mit Pentoxifyllin waren mit massiven Nekrosen und Abszessen deutlich stärker ausgeprägt als die der Kontrolltiere (Abb. 14 A, Seite 96; vgl. Abb. 6 A, Seite 90). Die Abszesse in der Leber dieser Tiere waren mit Bakterien beladen; große konfluierende Gruppenzellnekrosen wurden nicht beobachtet (Abb. 14 B, Seite 96). Die gleichzeitige Verabreichung von G-CSF und Pentoxifyllin hatte keinen Einfluß auf die histologischen Veränderungen in der Lunge im Vergleich zu alleiniger Gabe von Pentoxifyllin (Abb. 14 C, Seite 96) oder von G-CSF. In der Leber kamen zu den Abszessen die unter alleiniger G-CSF-Therapie beobachteten großen konfluierenden Gruppenzellnekrosen hinzu (Abb. 14 D, Seite 96).

4.5. Interaktion von G-CSF mit *K. pneumoniae* in vitro

Eine durch die Vorbehandlung mit G-CSF verursachte überschießende Produktion von TNF- α ist nach den klinischen und histologischen Ergebnissen unwahrscheinlich, da die Blockierung der Produktion von TNF- α keinen Einfluß auf Letalität, klinischen Verlauf oder Histologie hatte (vgl. 4.4.). Daher lag es nahe, nach einem anderen Mechanismus zu suchen, der den deletären Einfluß von G-CSF auf die Pneumonie erklären könnte. Bereits 1991 konnte die Bindung eines Zytokins (Interleukin-1) an ein gram-negatives Bakterium (*E. coli*) und daraus resultierend ein beschleunigtes bakterielles Wachstum nachgewiesen werden {2151}. Daher wurde untersucht, ob G-CSF das Verhalten von *K. pneumoniae* in vitro beeinflusst.

4.5.1. Wachstumsverhalten von *K. pneumoniae* unter dem Einfluß von G-CSF

Ein wichtiger bakterieller Virulenzfaktor ist die Wachstumsgeschwindigkeit. Daher wurde *K. pneumoniae* in der Gegenwart von G-CSF in einer Konzentration von 10 ng/ml angezüchtet. Diese Konzentration von G-CSF wurde gewählt, da sie bei pharmakologischen Studien als Konzentration im Serum bei klinisch verwendeter Dosierung von subkutan verabreichtem G-CSF gefunden wurde {124}{3574} und ebenfalls endogen bei Patienten mit neutropenischem Fieber produziert wird {2552}. Als Kontrolle wurde das Wachstum in der Gegenwart von IL-1 α und von Diluens (PBS) untersucht. In allen beobachteten Kulturen konnte keine Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit durch G-CSF im Vergleich zu IL-1 α oder zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 15).

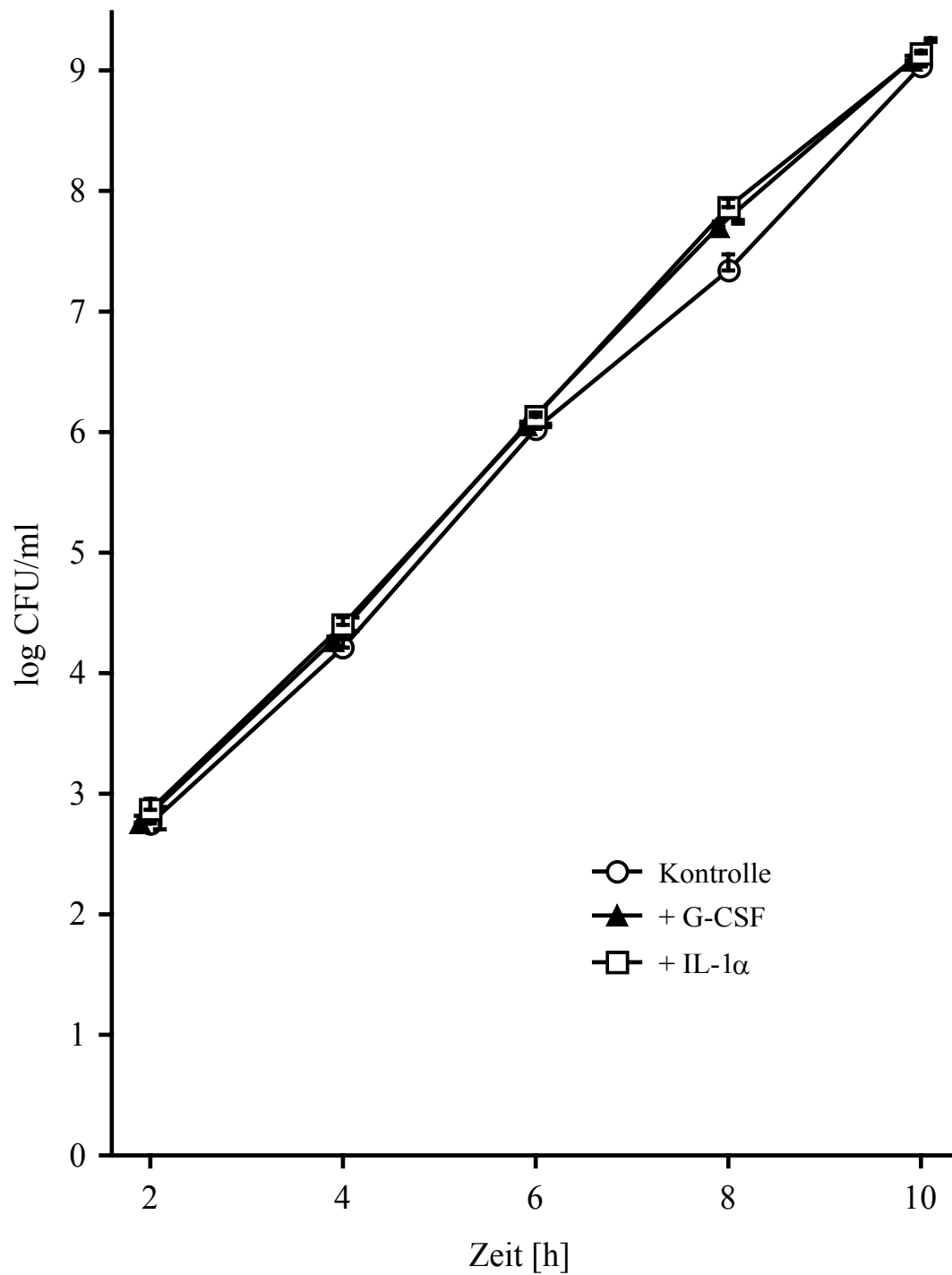


Abbildung 15: Wachstumsverhalten von *K. pneumoniae* B5055 in vitro unter dem Einfluß von G-CSF (10 ng/ml) oder IL-1α (2 ng/ml). Angegeben sind Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils im Doppelansatz.

4.5.2. Einfluß von G-CSF auf die Produktion von zellgebundenem KPS

Der entscheidende Virulenzfaktor von *K. pneumoniae* ist deren dicke Kapsel, die das Bakterium vor Phagozytose durch neutrophile Granulozyten schützt [3006]. Daher wurde untersucht, ob G-CSF die Produktion von zellgebundenem KPS erhöht und es somit den Keimen ermöglichen könnte, dem entscheidenden Abwehrmechanismus, der Phagozytose durch neutrophile Granulozyten, vermehrt zu entgehen. Es konnte gezeigt werden, daß dies tatsächlich der Fall ist. Im Gegensatz zu den Kontrollkulturen mit *Di-*luens alleine oder mit IL-1 α nahm die Menge an zellgebundenem KPS signifikant zu, wenn G-CSF dem Medium zugesetzt wurde (Abb. 16). Ein Stamm, der eine nur sehr geringe Produktion von KPS aufweist (*K. pneumoniae* F201), zeigte hingegen keine Erhöhung des zellgebundenen KPS durch G-CSF (Abb. 16, Inset).

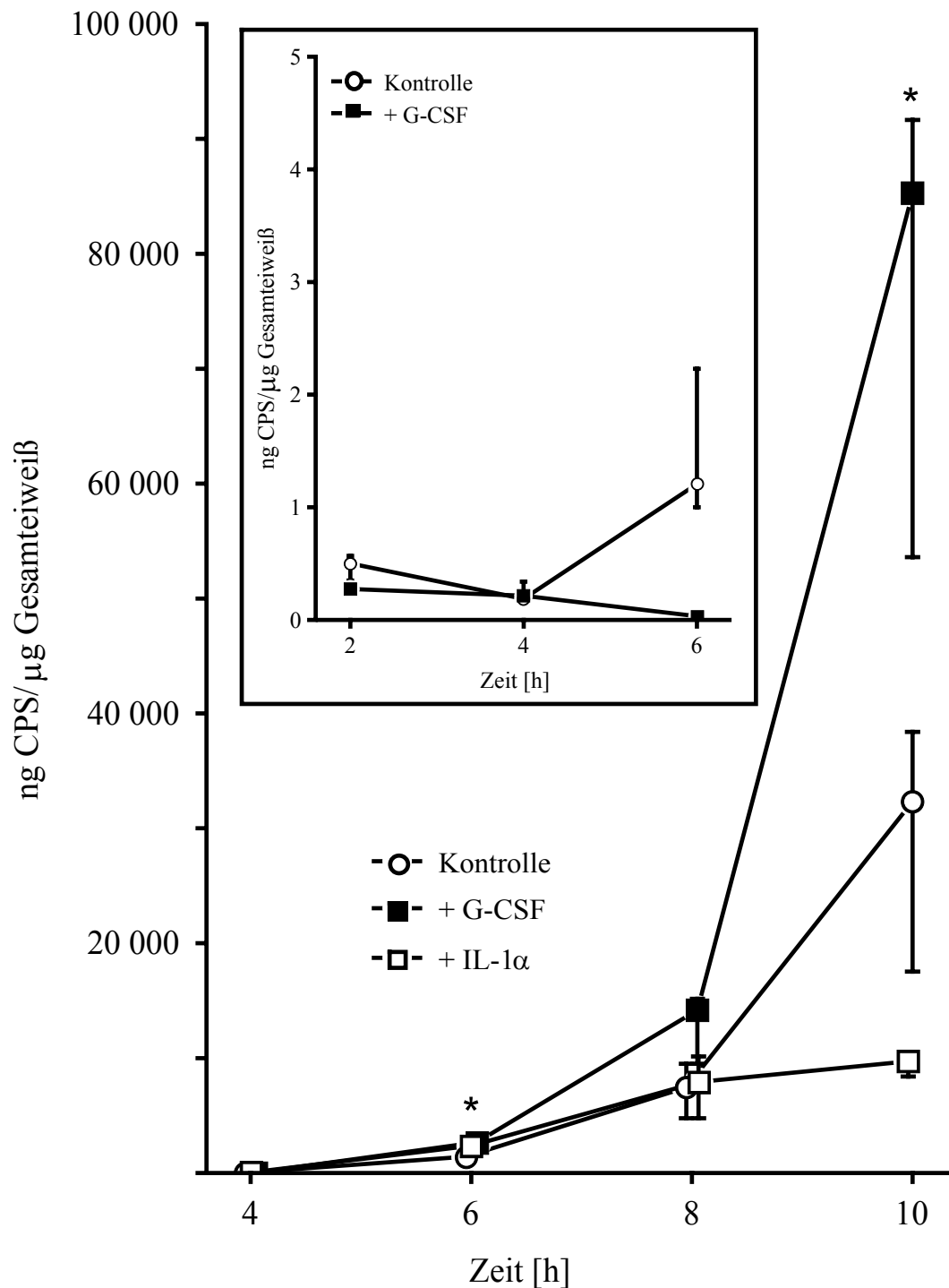


Abbildung 16: Produktion von K2-KPS durch *K. pneumoniae* B5055 oder F201 (Einsetzung) in vitro unter dem Einfluß von G-CSF (10 ng/ml) oder IL-1α (2 ng/ml). Angegeben sind Mittelwert \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten, jeweils im Doppelan- satz. *: $P = 0,02$ im Vergleich zu Bakterien, die nur in Medium angezüchtet wurden.

4.6. Funktionelle Bedeutung der Erhöhung der zellgebundenen KPS-

Produktion durch G-CSF

Um die funktionelle Wertigkeit der Steigerung der Produktion von zellgebundenem KPS durch G-CSF in vitro zu überprüfen, wurde ein Mikrophagozytose-Assay eingesetzt, der den Prozentsatz abgetöteter Bakterien bestimmt. Dies ist bedeutend, da phagozytierte Bakterien nicht notwendigerweise abgetötet werden, sondern sich sogar in den Phagolysosomen vermehren können {2317}. Es ließ sich nachweisen, daß in der Gegenwart von G-CSF gewachsene Bakterien signifikant weniger abgetötet werden als unbehandelte Kontrollkeime (Abb. 17). Bei keiner der Negativkontrollen konnte ein Absterben der Bakterien beobachtet werden. Um zu untersuchen, ob die Phagozytose von *K. pneumoniae* durch neutrophile Granulozyten ebenfalls inhibiert ist, wurden nach 60-minütiger Ko-Inkubation Bakterien und Granulozyten voneinander getrennt und die Menge der im Überstand verbliebenen Bakterien bestimmt. 84% der eingesetzten Keimmenge (Median, Quartile: 82,7% und 85,5%) wurden nach 60 Minuten wiedergewonnen, wenn die Bakterien in der Gegenwart von G-CSF angezüchtet wurden. Im Gegensatz dazu wurden nur 53,9% der eingesetzten Keimmenge (Median, Quartile: 52,9% und 59,2%) wiedergewonnen, wenn *K. pneumoniae* nur im Nährmedium angezüchtet wurde ($P = 0,014$). Damit konnte nachgewiesen werden, daß G-CSF die Produktion des entscheidenden Virulenzfaktors, von zellgebundenem Kapselpolysaccharid, signifikant vermehrt und somit die Phagozytose der Keime durch neutrophile Granulozyten als wichtigen Abwehrmechanismus gegen *K. pneumoniae* signifikant schwächt. Dies könnte die in vivo beobachteten Phänomene einer vermehrten septischen Ausbreitung von *K. pneumoniae* in mit G-CSF vorbehandelten Tieren und die dadurch erhöhte Letalität erklären.

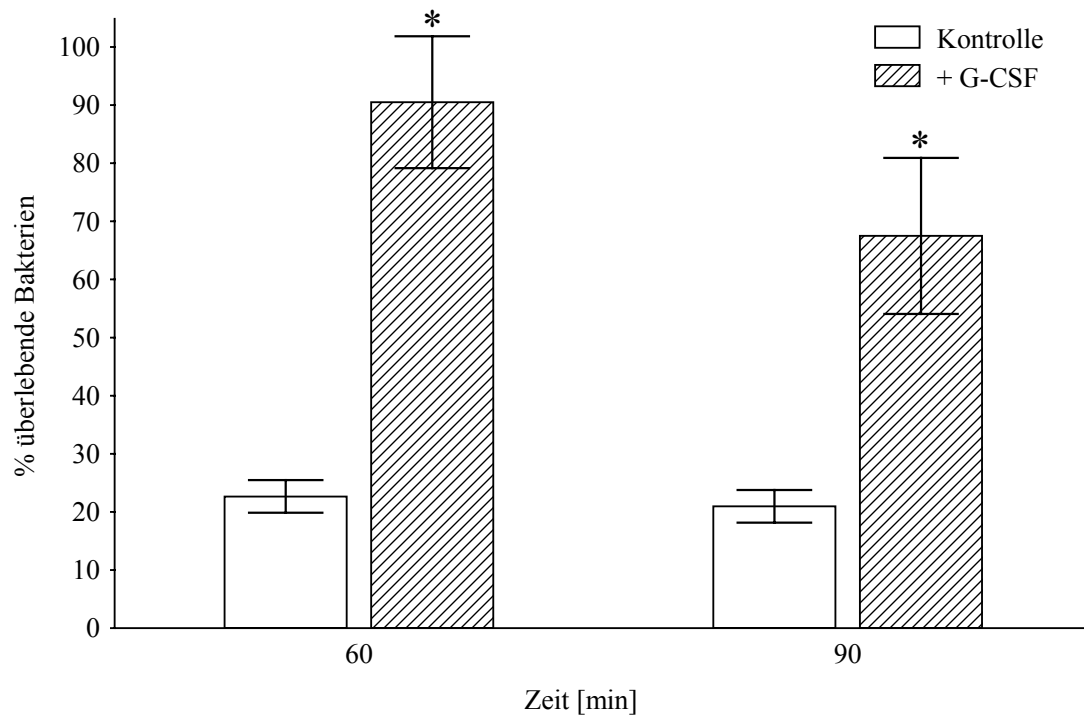


Abbildung 17: Inhibierung der Phagozytose und des bakteriellen Abtötens von *K. pneumoniae* B5055 durch neutrophile Granulozyten in vitro, wenn die Bakterien für 6 Stunden ohne oder mit G-CSF (10 ng/ml) angezüchtet wurden. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten, jeweils im Doppelansatz. *: $P = 0,014$ im Vergleich zu Bakterien, die nur in Medium angezüchtet wurden.

4.7. Bindung von G-CSF an *K. pneumoniae*

Hat G-CSF in vitro direkte und signifikante Wirkungen auf *K. pneumoniae*, so wäre der Nachweis einer Bindung dieses hämatopoetischen Wachstumsfaktors an den gram-negativen Organismus eine logische Konsequenz. Dieser Nachweis wurde mit zwei voneinander unabhängigen Methoden geführt.

4.7.1. Bindung von ^{125}J -G-CSF an *K. pneumoniae*

Zunächst wurden die Kriterien der Spezifität und Sättigbarkeit einer Bindung mittels radioaktiv markiertem G-CSF überprüft. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß ^{125}J -G-CSF sowohl an *K. pneumoniae* B5055 als auch an den avirulenten, nicht signifikant zellgebundenes KPS produzierenden Stamm F201 bindet; diese Bindung war sättigbar (Abb. 18). Um die Spezifität zu zeigen, wurden die Experimente wiederholt und un-

markiertes G-CSF in steigenden Konzentrationen beigesetzt. Dadurch war es möglich, ^{125}J -G-CSF dosisabhängig aus der Bindung an *K. pneumoniae* B5055 zu verdrängen (Abb. 19). Mit einem unverwandten Zytokin, IL-1 α , hingegen gelang dies nicht (Abb. 20). Somit konnte gezeigt werden, daß G-CSF an *K. pneumoniae* bindet und daß dies eine spezifische Bindung an das Bakterium war.

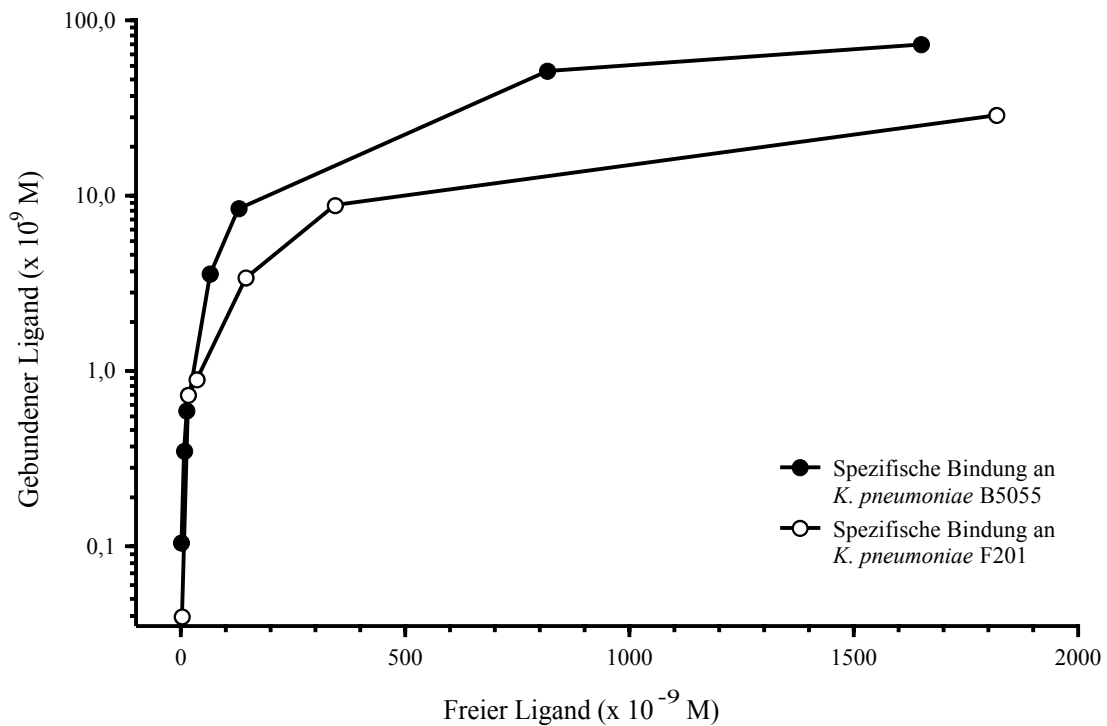


Abbildung 18: Bindung von ^{125}J -G-CSF an *K. pneumoniae* B5055 oder F201 nach 40 Minuten Inkubation bei 4°C.

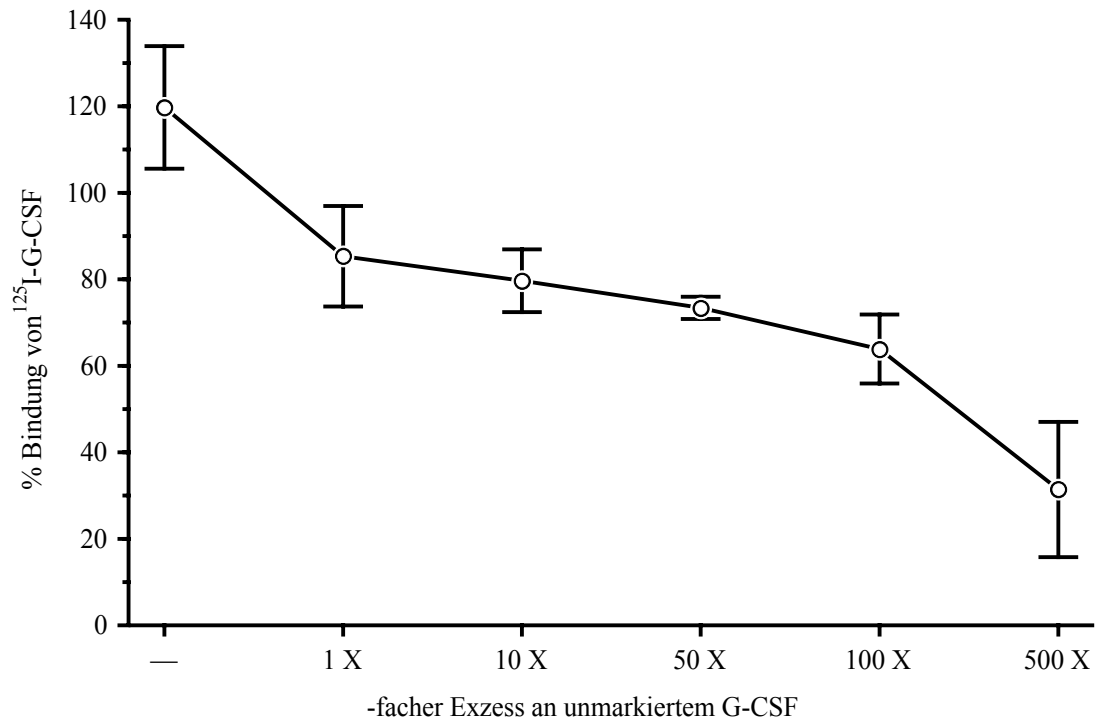


Abbildung 19: Inhibition der Bindung von ^{125}I -G-CSF an *K. pneumoniae* B5055 durch nicht markiertes G-CSF. ^{125}I -G-CSF (50 ng) wurde für 40 Minuten bei 4°C mit *K. pneumoniae* B5055 und den angegebenen Mengen an nicht markiertem G-CSF inkubiert. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten, jeweils im Doppelansatz, als spezifische Bindung relativ zu einem Experiment ohne Kompetitor.

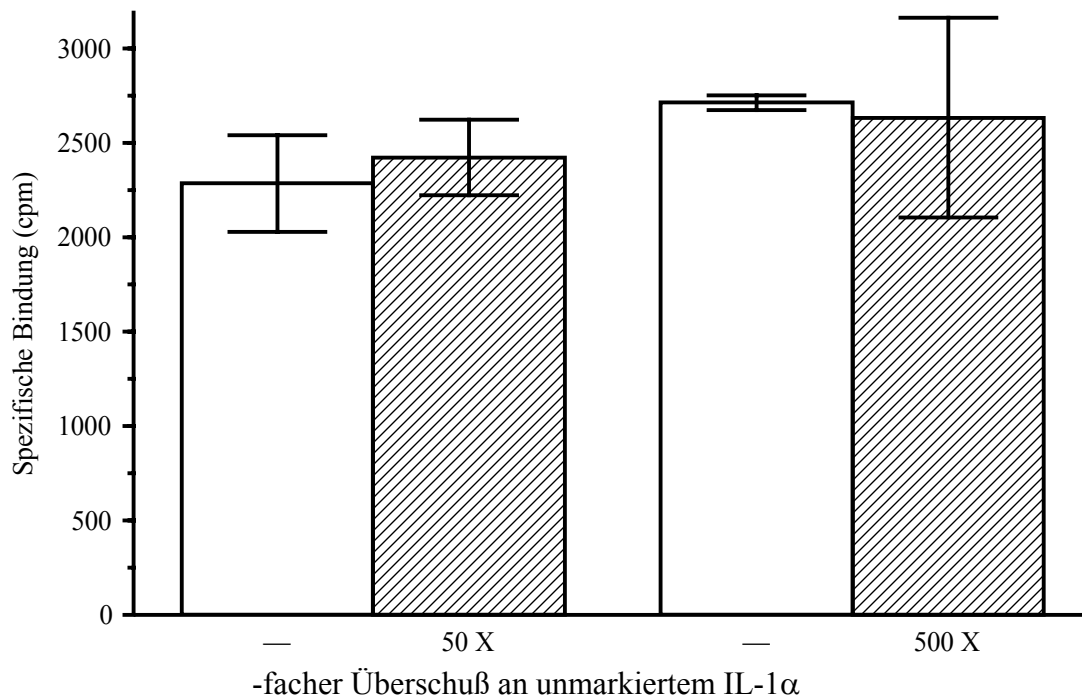


Abbildung 20: Fehlende Inhibition der Bindung von ^{125}I -G-CSF an *K. pneumoniae* B5055 durch nicht markiertes IL-1 α . ^{125}I -G-CSF (50 ng) wurde für 40 Minuten bei 4°C mit *K. pneumoniae* B5055 und den angegebenen Mengen an nicht markiertem IL-1 α inkubiert. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten, jeweils im Doppelansatz.

4.7.2. Immunoblotting

Die Bindung von G-CSF an *K. pneumoniae* wurde mittels immunologischer Verfahren näher charakterisiert. Dazu wurden aus unbehandelten Bakterien Lysate hergestellt und diese elektrophoretisch aufgetrennt und auf Membranen geblottet. Anschließend wurden die aufgetrennten bakteriellen Bestandteile mit G-CSF, anti-G-CSF und mit peroxidase-markiertem anti-Maus-IgG inkubiert und mittels Chemilumineszenz entwickelt. Dabei ließen sich drei spezifische Bindungsstellen von G-CSF darstellen, die eine Größe von 41, 25 und 21 kD aufwiesen (Abb. 21). Die Vorbehandlung des bakteriellen Lysates durch Proteinase K führte zum Verschwinden der Bindungsstellen, so daß diese zumindest proteinhaltig sein müssen (Abb. 21). Umfangreiche Kontrollen, von denen hier nur einige gezeigt sind, demonstrierten, daß dieser Bindungsnachweis spezifisch war.

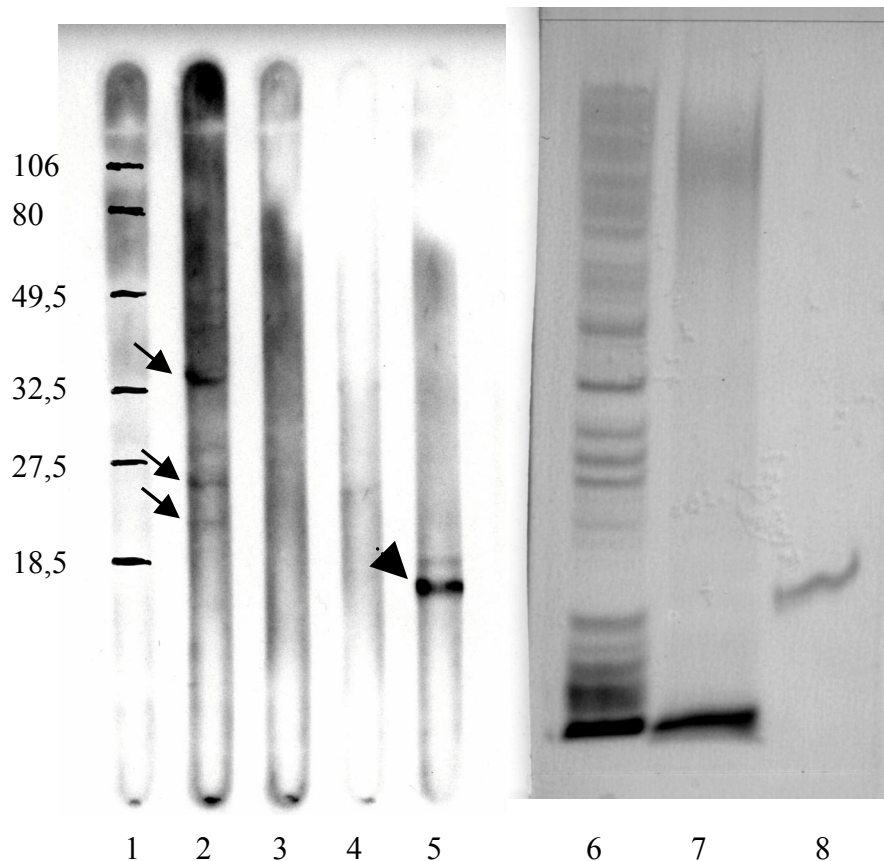


Abbildung 21: Immunoblot von *K. pneumoniae* B5055-Lysaten mit G-CSF. Bahn 1: Marker für Molekulargewicht in kDa; Bahn 2: bakterielles Lysat; Bahn 3: bakterielles Lysat, das vor der Elektrophorese mit Proteinase K verdaut wurde; Bahn 4: Inkubation mit G-CSF, das mit anti-humanem G-CSF-IgG präabsorbiert wurde; Bahn 5: Elektrophorese von G-CSF alleine als Positivkontrolle; Bahnen 6 bis 8: Silberfärbung eines identischen Zweitgeles, wobei Bahn 6 der Bahn 2 entspricht, Bahn 7 der Bahn 3 und Bahn 8 der Bahn 5. Die Pfeile in Bahn 2 markieren die spezifischen Bindungsstellen von G-CSF an Proteine im bakteriellen Lysat. Die Pfeilspitze in Bahn 5 markiert die Positivkontrolle mit G-CSF.

5. Diskussion

5.1. Wirkung des G-CSF im verwendeten Mausstamm

Humanes und murines G-CSF sind zu etwa 70% homolog in ihren Aminosäuresequenzen {3151}, und auch die entsprechenden Rezeptoren zeigen zu 62,5% Homologie {4187}. Die quantitative, nicht aber die qualitative Wirkung humanen G-CSFs in der Maus ist jedoch von der im Menschen verschieden {1525}. Um die Wirksamkeit des verwendeten humanen rekombinanten G-CSF im Stamm der BALB/c-Mäuse zu untersuchen, wurden daher den Tieren vor und während der subkutanen Gabe von G-CSF täglich Blut entnommen und die Gesamtleukozytenzahl sowie das Differentialblutbild bestimmt. Um einen Effekt der Blutabnahme allein auf die Anzahl und Zusammensetzung der Leukozyten im peripheren Blut erkennen zu können, wurde mit der Blutabnahme 4 Tage vor der ersten G-CSF-Dosis begonnen.

Die Ergebnisse zeigen, daß das verwendete rekombinante humane G-CSF im verwendeten Mausstamm aktiv war und dosisabhängig zu einem deutlichen Anstieg der Leukozyten im peripheren Blut führte. Dieser Anstieg war nicht artifiziell durch die Blutabnahme selbst bedingt (Abb. 1). Die Ergebnisse standen im Einklang mit bereits publizierten Studien der Leukozytenkinetik in der Maus nach G-CSF-Gabe {130} {131}, auch wenn die Mausstämme sich unterschieden. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die hier beobachteten Ergebnisse nicht auf einer verminderten oder gar fehlenden Wirksamkeit des verwendeten G-CSF beruhen. Da die meisten Arbeiten mit experimentellen bakteriellen Infektionen eine Dosierung von 2 x 50 µg/kg/die verwendeten, wurde diese Dosierung ausgewählt.

5.2. G-CSF verschlechtert das Überleben bei einer experimentellen *K. pneumoniae*-Pneumonie

Die Mehrzahl tierexperimenteller Untersuchungen zur Wirkung von G-CSF bei Infektionen zeigt einen günstigen Effekt auf das Überleben. So überlebten signifikant mehr Tiere bei einer experimentellen Infektion mit *K. pneumoniae* {77}, *S. pneumoniae* {2280} {2643}, *E. coli* {4127} {4206} {2378}, *P. aeruginosa* {75} {2378}, *L. monocytogenes* {4207} oder bei intraabdomineller Infektion durch Ligatur und Punktion des Zökums {4141} {4217} {4052} {2377}. Im Gegensatz hierzu verstarben bei der vorlieg-

enden Untersuchung signifikant mehr Tiere, wenn G-CSF vor Induktion der Pneumonie gegeben wurde (Abb. 3). Dies war am ausgeprägtesten bei der mittleren hier verwendeten Dosierung, wohingegen die Gabe von G-CSF ab 24 Stunden nach Infektion das Überleben im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nicht veränderte (Abb. 3). Auch der klinische Verlauf bis zum Ende der Experimente wurde durch G-CSF nicht positiv beeinflusst (Abb. 4). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu zwei vergleichbaren Arbeiten. In der ersten wurde ebenfalls mit *K. pneumoniae* bei Ratten eine Pneumonie induziert, und die prophylaktische Gabe von G-CSF in identischer Dosierung (50 µg/kg/die) von Tag -2 bis Tag 0 erhöhte das Überleben signifikant {77}. Leider wurden in dieser Arbeit die Keimzahlen nur in der Lunge untersucht und dies auch nur zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Infektion. Damit können weitere Vergleiche nicht direkt gezogen werden, da zum einen Angaben über septische Streuung der Bakterien in z.B. Leber oder Milz fehlen und zum anderen eine Aussage über den zeitlichen Verlauf einer bakteriellen Dissemination über mehr als 4 Stunden nach Infektion fehlen {77}. Die Tatsache eines signifikant besseren Überlebens der Tiere durch vorausgegangene Behandlung mit G-CSF läßt jedoch auf einen günstigen Einfluß des Wachstumsfaktors auf die bakterielle Streuung in diesem Modell schließen. Die zweite vergleichbare Arbeit verwendete zwar ein anderes Bakterium (*E. coli*), ein anderes Infektionsmodell (das der bakteriellen Peritonitis), und eine andere Dosierung von G-CSF (1 x 50 µg/kg/die von Tag -5 bis Tag +2, also eine Behandlung über den Zeitpunkt der Infektion hinaus) {4150}. Aber sie untersuchte das Zusammenwirken von G-CSF und einem monoklonalen, gegen die Kapsel von *E. coli* gerichteten IgM-Antikörper {4150}. Hier wurde kein Vorteil hinsichtlich des Überlebens gesehen, wenn G-CSF allein verabreicht wurde. Hingegen verbesserte sich das Überleben signifikant, wenn beide antiinfektiösen Therapieprinzipien zusammen eingesetzt wurden. Leider wurden auch hier wieder die Keimzahlen in Blut und peritonealer Lavage lediglich zu einem sehr frühen Zeitpunkt (90 Minuten nach Infektion) untersucht {4150}. Das synergistische Prinzip einer Therapie mit einem hämatopoetischen Wachstumsfaktor und einer immunologischen, gegen einen bakteriellen Virulenzfaktor gerichteten Therapie hinsichtlich der positiven Beeinflussung einer Infektion konnte also sowohl in der hier vorliegenden Arbeit als auch in der Literatur bestätigt werden.

Daneben gibt es aber auch andere Ergebnisse hinsichtlich der Beeinflussung einer experimentellen Infektion durch G-CSF. So wurde das Überleben einer intravenösen Infektion mit *P. aeruginosa* verschlechtert, wenn G-CSF nach Infektion gegeben wurde {4149}. Dieser Effekt konnte auch bei der Behandlung einer *E. coli*-Peritonitis und -Sepsis {2942} sowie bei Therapie einer *E. coli*-Pneumonie {4233} beobachtet werden.

5.2.1. G-CSF fördert die bakterielle Dissemination bei experimenteller *K. pneumoniae*-Pneumonie

Bei den hier durchgeführten Experimenten fiel auf, daß sich bei den allein mit G-CSF behandelten Tieren die Keimzahl im primär infizierten Organ, der Lunge, nicht durch den Wachstumsfaktor senken ließ (Abb. 5). Darüberhinaus wurde eine dosisabhängige Steigerung der bakteriellen Disseminierung bei prophylaktischer Gabe von G-CSF, erkennbar an den KBE-Indices, beobachtet (Tabelle 2). Auch die histologischen Befunde stützen diese Beobachtung, da in der Leber von mit G-CSF vorbehandelten Tieren nicht nur Nekrosen, sondern auch Abszesse mit hoher Bakterienzahl nachgewiesen werden konnten (Abb. 6). Diese bakterielle Disseminierung trat nicht in signifikantem Ausmaß auf, wenn mit der Gabe von G-CSF erst 24 Stunden nach Infektion begonnen wurde (Abb. 5, Tabelle 2). Auffällig war auch, daß bei der niedrigsten prophylaktisch verwendeten Dosierung, 2 x 15 µg/kg/die, ein höherer Keimgehalt in allen untersuchten Organen zu finden war (Abb. 5). Diese Ergebnisse können das verschlechterte Überleben bei einer prophylaktischen Behandlung mit G-CSF erklären. Auch diese Befunde stehen im Widerspruch zu anderen Arbeiten mit verschiedenen Infektionsmodellen, bei denen eine Abnahme der bakteriellen Besiedlung von Organen und der Bakteriämie unabhängig von den untersuchten Bakterien nachgewiesen wurde {77}{4141}{4206}{4207}{4217}{4226}. Zusätzlich ist bekannt, daß G-CSF die Phagozytose von Bakterien durch neutrophile Granulozyten fördert {3087}. Jedoch zeigt die Literatur in dieser Hinsicht auch entgegengesetzte Befunde. So konnte durch G-CSF die Anzahl der Bakterien im Liquor bei Pneumokokken-Meningitis nicht gesenkt werden {4239}. In neutropenischen Mäusen wurde ein Anstieg der Bakterienzahl in der Leber beobachtet, wenn G-CSF nach intravenöser Infektion mit *P. aeruginosa*, *S. aureus* oder *K. pneumoniae* verabreicht wurde {3043}. Somit sind in der Literatur auch Präzedenzfälle für die hier vorgestellten Beobachtungen zu finden.

5.2.2. Einfluß des Zeitpunktes der G-CSF-Therapie auf den Verlauf der experimentellen *K. pneumoniae*-Pneumonie

Die Erhöhung der Letalität durch G-CSF wurde nur beobachtet, wenn der Wachstumsfaktor vor Infektion verabreicht wurde, jedoch nicht, wenn mit der Gabe 24 Stunden nach Infektion begonnen wurde (Abb. 3). Die Keimzahlen in Lunge, Milz und Leber hingegen waren nicht von denen der Kontrollgruppe verschieden (Abb. 5). Auch der klinische Verlauf war mit dem der Kontrollgruppe identisch (Abb. 4). Die Beobachtung, daß der Zeitpunkt der Therapie entscheidend für den Verlauf der Infektion ist, findet sich in der Literatur wieder. Bei einer Infektion durch *C. albicans* wurde eine Erhöhung des Überlebens nur beobachtet, wenn G-CSF 24 Stunden vor Infektion gegeben wurde, eine Gabe 24 Stunden nach Infektion hatte keinen Einfluß {3895}. Der gleiche Effekt (verbessertes Überleben bei prophylaktischer, nicht aber bei therapeutischer Gabe) wurde in experimentellen Modellen einer i.v.-Infektion mit *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* {3043} oder einer abdominalen Mischinfektion {4141} nachgewiesen. Bei Gabe von LPS in Mäusen, die durch eine Retrovirus-induzierte murine Immundefizienz dafür sensibilisiert waren, war der zeitliche Spielraum für einen günstigen Effekt von G-CSF noch enger: die Gabe 12 oder 6 Stunden vor Injektion des LPS erhöhte das Überleben signifikant, aber die Gabe simultan mit oder 6 Stunden nach LPS hatte keinen Einfluß auf das Überleben {3869}. Erklärbar werden diese für einen günstigen Effekt von G-CSF engen zeitlichen Grenzen durch die Tatsache, daß das Netzwerk von Zytokinen und Wachstumsfaktoren eng miteinander verflochten ist {3896} {4133}. Schon geringe Änderungen von Dosierung oder Zeitpunkt können aber ein Zytokin entweder pro- oder anti-inflammatorisch wirken lassen {828}. Zusätzlich wird die Situation durch die Wichtigkeit der lokalen, parakrinen Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verkompliziert {3042} {3132} {4240} {3906} {3905} {643}. Zusammen mit den Unterschieden in den einzelnen Tiermodellen {1860} wird somit erklärbar, daß G-CSF bei unterschiedlichen Infektionsarten auch verschiedene optimale Zeitpunkte für den Einsatz besitzt.

5.3. Einfluß des monoklonalen Antikörpers gegen KPS auf den Verlauf der experimentellen *K. pneumoniae*-Pneumonie und Synergismus mit G-CSF

Alleine verabreicht, hatte der gegen bakterielles KPS gerichtete mAb III/5-1 einen günstigen Einfluß auf Überleben und klinischen Verlauf (Abbildungen 7 und 8). Auch die Keimzahlen in Lunge, Leber und Milz der Tiere konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gesenkt werden (Abb. 9). Dies bestätigte vorangegangene Untersuchungen, die in verschiedenen Tiermodellen einen positiven Einfluß der Antikörpertherapie auf den Verlauf experimenteller *K. pneumoniae*-Infektionen zeigten {98} {218}. Der negative Effekt einer prophylaktischen G-CSF-Gabe auf das Überleben der Tiere wurde durch den gleichzeitigen Einsatz des mAb III/5-1 aufgehoben (Abb. 7). Dies schlug sich auch im klinischen Verlauf nieder, der mit einer signifikant geringeren Gewichtsabnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur allein mit G-CSF behandelten Gruppe einherging (Abb. 8). Korrespondierend dazu konnte die vermehrte bakterielle Dissemination, die unter prophylaktischer G-CSF-Gabe beobachtet wurde, durch den simultanen Einsatz des mAb verhindert werden (Abb. 9). Dieser hier beobachtete Synergismus zwischen anti-infektiöser Therapie und Gabe des hämatopoetischen Wachstumsfaktors wird auch von anderen Autoren nachgewiesen. So hatte G-CSF allein keinen Einfluß auf das Überleben einer *E. coli*-Peritonitis bei nicht immunsupprimierten Mäusen, aber verbesserte dieses in synergistischer Weise zusammen mit einem gegen KPS von *E. coli* gerichteten mAb der Klasse IgM {4150}. Bei neutropenischen Ratten mit *P. aeruginosa*-Sepsis verdoppelte G-CSF zusammen mit IL-11 das Überleben auf 80%, das durch IL-11 alleine lediglich auf 40% erhöht wurde {4131}. Auch die durch G-CSF allein nicht signifikant beeinflussten Keimzahlen und LPS-Mengen im Blut wurden synergistisch durch den simultanen Einsatz beider Zytokine signifikant gesenkt {4131}. In verschiedenen Tiermodellen schließlich, bei dem die Tiere mit sowohl gram-positiven als auch gram-negativen Keimen infiziert wurden, wurde ein synergistischer Effekt von G-CSF und Antibiotika nachgewiesen {3043} {2378} {75} {4141}.

5.4. Die mögliche Beteiligung von $\text{TNF-}\alpha$ an den Leberzellnekrosen bei prophylaktischer Behandlung einer experimentellen *K. pneumoniae*-Pneumonie durch G-CSF

Bei den histologischen Befunden der Tiere, die G-CSF prophylaktisch vor Induktion einer *K. pneumoniae*-Pneumonie erhielten, fielen zunächst in der Leber großflächige Nekrosen auf, die von Infiltraten durch neutrophile Granulozyten begleitet waren (Abb. 6). Es ist bekannt, daß bei transgenen, G-CSF überexprimierenden Mäusen vermutlich durch Infiltration neutrophiler Granulozyten bedingte Leberzellnekrosen auftreten {4230}. Auch bei Tumoren, die G-CSF paraneoplastisch produzieren, konnten ähnliche histologische Veränderungen beobachtet werden {2190}. Daher könnten die jetzt beobachteten Veränderungen direkt durch G-CSF verursacht worden sein. Allerdings wurde gezeigt, daß die Gabe von G-CSF nicht zu einer erhöhten Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in der Leber führt und auch nicht zu einer vermehrten lokalen Produktion chemotaktischer Faktoren wie CINC {4120}. Die Vorbehandlung mit G-CSF vor einer LPS-Stimulation führte sogar zu einer Reduktion von CINC und ICAM-1 in der Leber {4120}. Somit ist ein direkter Effekt von G-CSF, der diese Nekrosen erklären könnte, hier eher unwahrscheinlich.

In der oben erwähnten Arbeit von Suzuki et al. wurde auch gezeigt, daß mit den histologischen Veränderungen eine erhöhte Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6) einherging {2190}. Da aber die Produktion von IL-1 und IL-6 sich gleichsinnig mit der von $\text{TNF-}\alpha$ verändern {4133} {828}, darf angenommen werden, daß auch $\text{TNF-}\alpha$ in erhöhter Konzentration vorlag, obgleich dies nicht direkt gemessen wurde {2190}. Die Gabe von G-CSF alleine oder vor LPS-Stimulation erhöhte die Konzentration von $\text{TNF-}\alpha$ und von löslichen $\text{TNF-}\alpha$ -Rezeptoren im Serum {3903} {4198} {3902}. Die ortsständigen Makrophagen in der Leber (Kupffer-Zellen) aber produzieren sowohl einen Rezeptor für $\text{TNF-}\alpha$ als auch $\text{TNF-}\alpha$ selbst auf eine Stimulation mit LPS hin {4172} {4173}. Auf der anderen Seite jedoch schwächt G-CSF die Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ und IL-6 durch Kupffer-Zellen nach LPS-Stimulation ab {4171}. Daher sollte untersucht werden, ob die bei prophylaktischer G-CSF-Gabe beobachteten histologischen Veränderungen auch bei einer Blockade von $\text{TNF-}\alpha$ auftreten.

5.4.1. Effekte von Pentoxifyllin auf TNF- α

TNF- α besitzt eine wichtige Funktion bei der koordinierten Abwehr der *K. pneumoniae*-Infektion und ist damit nicht als rein pro-inflammatorisches Zytokin anzusehen {4240} {4242} {4180}. Daher wurde Pentoxifyllin anstelle blockierender monoklonaler Antikörper eingesetzt. Von Pentoxifyllin ist bekannt, daß es die Transskription des TNF- α -Genortes in TNF- α -mRNA in Makrophagen hemmt und die Akkumulation von TNF- α -mRNA inhibiert {1707} {1698}, aber nicht die Translation von TNF- α -mRNA in das Zytokin {1707}. Dies erklärt die Tatsache, daß Pentoxifyllin die Antwort auf einen LPS-Reiz im Menschen nicht komplett verhindert {1695} und auch selektiv nur auf TNF- α wirkt {1695}. Zusätzlich bietet Pentoxifyllin den Vorteil, daß es keinen Effekt auf Wirkungen von G-CSF oder GM-CSF in vitro aufweist {1687} {3884}. Über eine Reduktion der durch TNF- α erhöhten Adhärenz von neutrophilen Granulozyten verhindert Pentoxifyllin den Leukozytenabfall nach LPS-Stimulation und erhöht den Pool zirkulierender Granulozyten {1695}.

5.4.2. Einfluß von Pentoxifyllin auf die experimentelle *K. pneumoniae*-Pneumonie und den Effekt einer prophylaktischen G-CSF-Gabe

Wurden die Tiere mit Pentoxifyllin behandelt, so konnte eine Verzögerung der Letalität der *K. pneumoniae*-Pneumonie beobachtet werden (Abb. 11). Jedoch war Pentoxifyllin nicht in der Lage, die durch prophylaktische G-CSF-Gabe hervorgerufene erhöhte Letalität zu verhindern (Abb. 11). Auch der klinische Verlauf bis zum Ende der Experimente wurde weder durch Pentoxifyllin alleine noch durch die gleichzeitige Gabe von G-CSF und Pentoxifyllin beeinflusst (Abb. 12). Bei der Untersuchung der Keimzahlen fiel auf, daß die nur mit Pentoxifyllin behandelten Tiere eine etwa 100-fach höhere Anzahl von Bakterien in allen untersuchten Organen aufwiesen (Abb. 13). Dies änderte sich nicht signifikant, wenn die Tiere G-CSF prophylaktisch erhielten (Abb. 13). Insbesondere die histologischen Befunde in den Lebern der Tiere, die nur G-CSF (2 x 50 μ g/kg/die) prophylaktisch erhielten und denen, die zusätzlich mit Pentoxifyllin behandelt wurden, unterschieden sich nicht wesentlich (Abb. 14). Daraus kann geschlossen werden, daß eine eventuelle überschießende TNF- α -Produktion vermutlich nicht für die beobachteten hepatischen Nekrosen verantwortlich ist. Vielmehr ist zu vermuten,

daß andere Mechanismen für die Veränderungen in Frage kommen. Zum einen wurde durch Pentoxifyllin die TNF- α -Produktion effektiv gehemmt, zum anderen ist bekannt, daß eine Behandlung mit G-CSF bei experimentellen Infektionen den lokalen und systemischen TNF- α -Gehalt signifikant senkt {4141}{4127}{3895}{4239}{4150}{2563}{4206}{4217}. Der Befund einer deutlich erhöhten Keimzahl nach Blockierung von TNF- α und damit einer Verschlechterung der antibakteriellen Abwehr steht in Einklang mit anderen Berichten, die die Bedeutung von TNF- α für eine Abwehr bakterieller Infektionen zeigen {4240}{4242}{2926}{2560}{4180}. Da Histologie, Überleben und Keimzahl in den Organen gut korrelieren {3895}, auf der anderen Seite aber die Messung von Zytokinen im Serum methodisch schwierig ist {2085} und die Befunde in ihrer Wertigkeit nicht unumstritten {1985}{3085}{3086} sind, wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Bestimmung von Zytokinen verzichtet.

5.5. Ist eine pulmonale Schädigung durch G-CSF für die erhöhte Letalität verantwortlich?

Es wurde vermutet, daß G-CSF durch den erhöhten Influx aktivierter neutrophiler Granulozyten in die Lunge schädigend während einer Infektion sein könnte. Hierholzer et al. konnten zeigen, daß eine direkte intratracheale Instillation von G-CSF zu einem Einstrom neutrophiler Granulozyten in die Lunge und zu einem alveolären capillary leakage führt {4229}, vermutlich auch dadurch mitbedingt, daß G-CSF auf neutrophile Granulozyten und Monozyten chemotaktisch wirkt {4219}. Die gleiche Arbeitsgruppe beobachtete in ähnlichen Experimenten bei Ratten Lungenödem, Hypoxie, Alkalose und einer Zunahme des Zellgehaltes in der bronchoalveolären Lavage nach intratrachealer G-CSF-Gabe {4130}. Ratten, die einem hämorrhagischen Schock unterworfen wurden, wiesen einen bis zu siebenfach erhöhten Gehalt an G-CSF-mRNA in der Lunge auf, wobei bronchoepitheliale Zellen der Hauptproduktionsort waren {4176}. Dies war mit einer akuten Lungenschädigung, einer pulmonalen Infiltration durch neutrophile Granulozyten, Lungenödem und Hypoxie assoziiert {4176}. G-CSF alleine führte zu Lungenschaden und einem Anstieg der pulmonalen neutrophilen Granulozyten und erhöhte signifikant die Letalität eines chemisch-toxisch induzierten Lungenschadens durch HCl {2644}. Die Zunahme eines pulmonalen Schadens bei *E. coli*-Pneumonie durch Gabe von G-CSF wurde ebenfalls beschrieben {4233}. TNF- α und LPS stimu-

lieren die Produktion von G-CSF durch humane Endothelzellen {3896}{1988}, was auch bei humanen Synovial- und Lungen-Fibroblasten nachgewiesen wurde {1979}{1722}, in letzterem Fall auch durch IL-1 {1722}. Somit könnte eine bei einer gram-negativen Infektion auftretende LPS-Stimulation und die erhöhte Produktion von TNF- α und IL-1 {3806}{4233} die lokale Produktion von G-CSF verstärken und über den vermehrten pulmonalen Einstrom neutrophiler Granulozyten, die durch parakrin gebildetes G-CSF aktiviert werden, zu vermehrtem Gewebeschaden in der Lunge führen. Auch beim Menschen sind negative pulmonale Effekte von G-CSF beschrieben worden. So trat bei zwanzig Patienten, die nach einer Chemotherapie mit potentiell lungentoxischen Zytostatika G-CSF erhielten, eine interstitielle Pneumonie ohne Erregernachweis auf {4213}. Allerdings wurde nicht die Gesamtzahl der mit G-CSF behandelten Patienten angegeben, so daß die Inzidenz dieser bei 3 von 20 Patienten tödlich verlaufenen Komplikation nicht errechnet werden kann {4213}. Die Gabe von G-CSF bei Neutropenie nach Chemotherapie war in einer weiteren retrospektiven Studie signifikant mit einer aufgrund pulmonaler Infektionen erhöhten Inzidenz des ARDS assoziiert {4138}.

Die Histologien der Lungen der mit G-CSF vorbehandelten Tiere (Abb. 6) sprechen hier gegen die Annahme einer durch G-CSF aggravierten Lungenschädigung. Im Vergleich zu den pulmonalen Befunden bei Kontrolltieren ist sogar ein geringeres Ausmaß der inflammatorischen Veränderungen zu sehen: Abszesse sind nicht vorhanden (Abb. 6). Die Literatur stützt die Annahme, daß G-CSF nur in bestimmten Situationen (direkte pulmonale Applikation) zur vermehrten Lungenschädigung führt. So konnte keine Zunahme der durch LPS verursachten pulmonalen Veränderungen durch systemische G-CSF-Gabe bei Schafen beobachtet werden {3888}{3893}. Bei gesunden Probanden verhinderte subkutan appliziertes G-CSF die durch LPS verursachte Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in der Lunge {3902}. Bei transgenen, G-CSF überexprimierenden Mäusen konnten über einen Zeitraum von einem Jahr nur sehr selten pulmonale Läsionen beobachtet werden {4230}. Die prophylaktische Gabe von G-CSF vor experimenteller *E. coli*-Pneumonie bei Hunden verschlechterte die pulmonale Funktion nicht {4127}. In einem Modell für intraabdominelle Infektion und Sepsis bei hämorrhagischem Schock konnten Davis et al. keinen Anhalt für einen durch neutrophile Granulozyten verursachten Lungenschaden nach G-CSF-Therapie finden {4134}. Eine mögli-

che Erklärung dieser widersprüchlichen Befunde könnte darin liegen, daß in allen Studien, die keine Erhöhung der pulmonalen Läsionen durch G-CSF nachweisen konnten, der Wachstumsfaktor systemisch gegeben wurde, wohingegen die oben angeführten Arbeiten die lokale intrapulmonale Applikation von G-CSF untersuchten {4229} {4130} {2644}. In vitro jedoch inhibiert G-CSF die durch IFN- γ und TNF- α hervorgerufene Überproduktion von NO und die Expression von iNOS {4123}. Eine Überexpression von iNOS und Überproduktion von NO hingegen ist nicht nur günstig {4243}, sondern kann unter bestimmten Umständen bei Infektionen schädlich sein {3495}. Daher ist es möglich, daß systemisch gegebenes G-CSF über die Inhibierung einer erhöhten NO-Produktion bei Infektionen einen günstigen Effekt hat, während lokal verabreichtes und somit in wesentlich höherer Konzentration pulmonal vorhandenes G-CSF durch überschießende Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zur pulmonalen Schädigung führt. Bei den hier vorliegenden Experimenten ist vermutlich die erste Annahme der Fall, da histologisch geringer ausgeprägte entzündliche Infiltrate nachgewiesen werden konnten.

5.6. Gibt es eine andere Erklärung für die Beobachtungen?

Mit den bisher untersuchten Hypothesen ist es nicht möglich, die komplexen Befunde der G-CSF-Therapie bei experimenteller *K. pneumoniae*-Pneumonie einheitlich zu erklären. Das Konzept einer direkten Wirkung von G-CSF auf *K. pneumoniae* mit konsekutiver Steigerung der bakteriellen Virulenz hingegen wäre dazu in der Lage. Würde G-CSF die Virulenz von *K. pneumoniae* steigern, so wäre die erhöhte Letalität bei prophylaktischer Gabe von G-CSF plausibel, da zum Zeitpunkt der Infektion hohe Mengen an G-CSF bereits vorhanden sind. Auch die Tatsache, daß der therapeutische Einsatz von G-CSF nicht zu einer Erhöhung der Letalität führte, ließe sich damit in Einklang bringen. Eine gesteigerte Virulenz der Bakterien wäre auch mit der bei alleiniger G-CSF-Gabe beobachteten vermehrten bakteriellen Disseminierung in zunächst nicht infizierte Organe kompatibel. Wäre die gesteigerte Virulenz durch eine gesteigerte Produktion von KPS bedingt, so würde dies erklären, warum der mAb III/5-1 in der Lage war, nicht nur die nachteiligen Effekte einer prophylaktischen G-CSF-Gabe aufzuheben, sondern auch synergistisch mit G-CSF die besten Ergebnisse in der Behandlung der experimentellen Infektion zu zeigen, da dann die durch G-CSF gesteigerte Virulenz

inhibiert wäre, und die aus der Literatur bekannten günstigen Wirkungen des Wachstumsfaktors überwiegen könnten.

5.6.1. Direkte Effekte von G-CSF auf *K. pneumoniae*

Die Beeinflussung von Bakterien durch Proteine eukaryoter Zellen und Wachstumsfaktoren wurde bereits beschrieben. So konnte gezeigt werden, daß die spezifische Bindung von IL-1 an *E. coli* zu einer Steigerung des bakteriellen Wachstums führt {2151}. Auch IL-2 und GM-CSF haben wachstumsfördernde Eigenschaften bei *E. coli* {2168}. IL-6 bindet spezifisch an *M. avium* und fördert dessen Wachstum {2165} {2166}. Auch Insulin zeigt spezifische Wirkungen auf den Stoffwechsel von *E. coli* und erhöht dessen Wachstumsrate {4184}. Daher wurde hier zuerst untersucht, ob G-CSF einen Einfluß auf das Wachstum von *K. pneumoniae* hat. Dies konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 15). Bei zwei anderen Pathogenen, *C. albicans* und *P. aeruginosa*, wurde ebenfalls kein direkter wachstumsfördernder Effekt von G-CSF gefunden, allerdings wurde nur dieser Einzelaspekt untersucht {3895} {2569}. Der Einfluß von G-CSF auf die Produktion des wichtigsten Virulenzfaktors von *K. pneumoniae*, dem KPS, war jedoch signifikant. Eine geringe Menge an G-CSF (10 ng/ml), wie sie nach subkutaner Gabe von hier verwendeten Dosierungen über lange Zeit erreicht wird {146} {124} {3574}, erhöhte signifikant die Produktion von zellgebundenem KPS (Abb. 16). Dies war jedoch nur beim virulenten Stamm *K. pneumoniae* B5055 der Fall, nicht aber beim avirulenten Stamm *K. pneumoniae* F201, der nicht zu einer klinisch bedeutenden Produktion von KPS fähig ist (Abb. 16). Auch diese Befunde werden durch andere Arbeiten bestätigt, in denen die Wirkung von Zytokinen nur bei virulenten, nicht aber bei avirulenten Keimen gesehen wird {2168} {2151} {2166}. Die funktionelle Bedeutung der gesteigerten Produktion von zellgebundenem KPS ließ sich in zwei Assays nachweisen, die zeigten, daß der erhöhte Gehalt an zellgebundenem KPS die Phagozytose der Bakterien durch neutrophile Granulozyten inhibiert (vgl. 4.6.) und zu einer signifikant geringeren Abtötung der Keime führt (Abb. 17).

5.6.2. G-CSF bindet spezifisch an *K. pneumoniae*

Da G-CSF somit die Virulenz von *K. pneumoniae* steigert, wurde untersucht, ob dieser Wachstumsfaktor an das Bakterium bindet. Dies erfolgte mittels mit ^{125}J markiertem G-CSF. Die Bindung von ^{125}J -G-CSF an *K. pneumoniae* war spezifisch, da sie zum einen eine typische Sättigungskurve aufwies (Abb. 18), zum zweiten durch unmarkiertes, im Überschuß vorhandenes G-CSF dosisabhängig aus der Bindung verdrängt wurde (Abb. 19) und zum dritten nicht von einem anderen Zytokin, IL-1, beeinflusst wurde (Abb. 20). Damit im Einklang steht der fehlende Effekt von IL-1 auf die Produktion von zellgebundenem KPS (Abb. 16).

Um die Bindung von G-CSF an *K. pneumoniae* näher zu charakterisieren, wurde mittels Immunoblotting versucht, mögliche Bindungsstellen zu finden. Im Lysat ganzer, unbehandelter Bakterien konnten nach elektrophoretischer Auftrennung, Blotting auf eine Membran und Inkubation mit G-CSF drei zur Bindung fähige Proteinmoleküle identifiziert werden, die ein Molekulargewicht von 41, 25 und 21 kDa aufwiesen (Abb. 21). Da diese Bindungsstellen nach Verdauung des Lysates mit Proteinase K nicht mehr nachweisbar waren, darf auf eine zumindest teilweise Proteinnatur dieser Moleküle geschlossen werden (Abb. 21).

Die Charakterisierung der Bindungsstellen für G-CSF an *K. pneumoniae* zeigt zumindest vom Molekulargewicht, daß sie von den bisher beschriebenen Rezeptoren unterschiedlich sein müssen. So weist der G-CSF-Rezeptor der Maus ein Molekulargewicht von 91 kDa auf {4205}, der humane G-CSF-Rezeptor auf Thrombozyten eines von 150 kDa {4208} sowie der humane G-CSF-Rezeptor auf verschiedenen Zellarten der myeloischen und lymphatischen Zellreihen und auf der Plazenta eines von 150 kDa {177}. Es scheint aber zumindest zwei Arten von humanen G-CSF-Rezeptoren mit einem Molekulargewicht von 150 kDa und 120 kDa auf Plazenta- und Trophoblastenzellen {4186} bzw. von 142 kDa und 92 kDa auf neutrophilen Granulozyten {4202} zu geben, wobei eine unterschiedliche Glykosylierung die Differenzen im Molekulargewicht erklären könnte, da Larsen et al. den Prozentsatz an Kohlenhydraten auf etwa 35% des Molekulargewichtes schätzen {177}. Die Analyse der Dissoziationskonstanten zeigt eine weite Variation der K_d , die von 240 pM bis 700 pM reicht {177} {4186} {4202} {4208}. Dies läßt den Schluß zu, daß zumindest zwei verschiedene

humane G-CSF-Rezeptoren existieren, die extrazellulär sowohl eine Immunglobulin-ähnliche als auch eine Fibronektin Typ III-ähnliche Domäne besitzen {127}.

High-affinity-Rezeptoren auf Bakterien für Zytokine wurden ebenfalls bei *Shigella flexneri* und TNF- α beschrieben {2189}. Für Kollagen und Fibrinogen existieren auf *E. coli* ebenfalls spezifische Rezeptoren {2169}. Plasminogen bindet an eine ganze Reihe gram-negativer Bakterien mittels spezifischer Rezeptoren (*Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*) und einer biphasischen Interaktion zwischen Plasminogen und dem Rezeptor auf *H. influenzae* und *B. catarrhalis* {2170}. Spezifische Bindungen wurden ebenfalls für IL-6 an *M. avium* {2166} und für TNF- α an *S. typhimurium*, *E. coli*, *Streptococcus mitis*, *S. aureus* und *L. monozytogenes* beschrieben {2189}. Ein direkter Vergleich mit anderen Arbeiten ist aber schwierig, da die Konsequenzen einer Interaktion zwischen Zytokinen und anderen eukaryoten Proteinen und pathogenen Keimen nur in Ansätzen untersucht wurden. So zeigten Porat et al. zwar, daß sich das Wachstum von *E. coli* durch den Einfluß von IL-1 verzehnfacht. Jedoch wird dies relativiert, wenn man die Absolutwerte betrachtet, da nach 2 Stunden die Keimzahlen von $1 \times 10^6/\text{ml}$ auf $1 \times 10^7/\text{ml}$ erhöht waren {2151}. Eine Auswirkung dieses Effektes in vivo wurde jedoch nicht untersucht. Zusätzlich ist anzumerken, daß andere Arbeitsgruppen mit identischen Materialien und Untersuchungsbedingungen die Ergebnisse von Porat et al. nicht reproduzieren konnten {4204}. Auch die anderen Arbeiten zeigten lediglich in vitro eine Stimulation des Wachstums, ohne die in vivo-Relevanz der Beobachtungen weiter zu untersuchen {2165} {2169} {2170} {2167} {2168} {2166}. Lediglich eine Arbeit geht zumindest in vivo auf die Auswirkungen der Bindung von TNF- α auf *S. flexneri* ein und weist nach, daß in Gegenwart von TNF- α gewachsene Keime in vitro eine erhöhte Invasivität für HeLa-Zellen, einer humanen Zervixkarzinom-Zelllinie, aufweisen, was für eine Virulenzsteigerung von *S. flexneri* durch TNF- α spricht {2189}.

Einige Arbeiten sprechen dafür, daß Bakterien sich einen Vorteil durch die Verwendung von Proteinen eukaryoter Zellen verschaffen. So produziert *E. coli* Proteine, die IL-1-ähnliche Eigenschaften aufweisen und kolonie-stimulierende Aktivität bei humanen peripheren Blutstammzellen und Knochenmarkstammzellen zeigen {4190} {4191}. Da das Wachstum von *E. coli* durch IL-1 stimuliert wird {2151}, ist ein positiver Regelk-

reis möglich. *E. coli* produziert aber auch ein Protein, das Homologie zu humanem CD5 aufweist und sich wie ein Immunglobulin faltet {4201}. Die Autoren vermuten, daß diese Eigenschaft durch horizontalen Gentransfer erworben wurde und daß Gene, die eukaryote Zell-Zell-Interaktionen regulieren, von Bakterien rekrutiert worden sind, um die Adhärenz von Bakterien an eukaryote Zellen zu erleichtern {4201}.

5.6.3. Vergleich der Befunde mit anderen tierexperimentellen Untersuchungen unter dem Gesichtspunkt einer direkten Wachstumsfaktor-Bakterien-Interaktion

Die hier erhobenen Befunde der Verschlechterung einer *K. pneumoniae*-Pneumonie durch G-CSF stehen auf den ersten Blick in Kontrast zu anderen Arbeiten, die einen günstigen Effekt von G-CSF auf eine *K. pneumoniae*-Pneumonie zeigen {77}. Bei näherer Betrachtung jedoch zeigen sich große Unterschiede. Der Bakterienstamm, den Nelson et al. verwendeten, scheint eher avirulent zu sein, da eine Keimmenge von 5×10^7 KBE benötigt wurde, um einen letalen Ausgang der Pneumonie hervorzurufen {77}. Daher könnten diese Ergebnisse auch eher durch eine Intoxikation mit LPS denn durch eine Replikation und Disseminierung der Bakterien hervorgerufen sein. Im Gegensatz dazu ist der Bakterienstamm, der hier verwendet wurde, noch virulenter (basierend auf der KPS-Produktion {98}) als ein in früheren Arbeiten benutzter Stamm (*K. pneumoniae* Caroli), bei dem bereits 3×10^4 KBE genügten, um eine fulminante Pneumonie bei Ratten hervorzurufen {218}. Daher könnte es sein, daß die direkte Wirkung von G-CSF auf *K. pneumoniae* nicht ausreichte, um im Modell der anderen Arbeitsgruppe die günstigen Wirkungen von G-CSF (Aktivierung und Vermehrung der neutrophilen Granulozyten) aufzuheben {77}. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Stamm *K. pneumoniae* F201 untersucht, der nicht letal ist (Seite 6). An diesen band G-CSF ebenfalls (Abb. 18). Trotz dieser Bindung von G-CSF, deren Verhalten der an den virulenten Stamm *K. pneumoniae* B5055 ähnlich war, war G-CSF nicht in der Lage, die minimale Produktion von KPS bei Stamm *K. pneumoniae* F201 zu steigern (Abb. 16). Dies steht in Einklang mit den oben aufgeführten Arbeiten, die eine Beeinflussung nur virulenter Stämme durch Bindung von Zytokinen zeigen. In der Tat wurden in allen vergleichbaren Arbeiten mit G-CSF (Untersuchung nur eines Bakteriums und Infektionsmodelles, nicht immunsupprimierte Tiere), die einen günstigen Einfluß von G-CSF

auf das Überleben zeigen, Keimdosen zwischen 5×10^6 und $1,5 \times 10^{10}$ KBE verwendet, um Letalität hervorzurufen {4233} {4127} {145} {4207} {4206} {75} {2280}.

6. Zusammenfassung

Neben den gut untersuchten Wirkungen von G-CSF auf die Granulopoese liegen Untersuchungen vor, daß es direkte Effekte auf die Rekrutierung und Aktivierung bakterizider Eigenschaften neutrophiler Granulozyten besitzt, was in einem verbesserten Überleben bakteriell infizierter Tiere resultiert. Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Effekt einer prophylaktischen oder therapeutischen Gabe von G-CSF bei experimenteller Pneumonie durch *Klebsiella pneumoniae* untersucht. Unerwarteterweise verschlechterte aber eine prophylaktische G-CSF-Gabe das Überleben. Die prophylaktische Gabe von G-CSF führte dosisabhängig zu einer Steigerung der bakteriellen Dissemination von der Lunge in Leber und Milz. Im Gegensatz dazu konnte ein spezifisch gegen K2-Kapselpolysaccharid (K2-KPS) von *K. pneumoniae* gerichteter monoklonaler Antikörper (mAb III/5-1) signifikant die Vermehrung der Bakterien in Lunge, Leber und Milz reduzieren. Wurde die prophylaktische Gabe von G-CSF mit der Gabe des mAb III/5-1 kombiniert, so konnten die deletären Effekte einer Therapie mit G-CSF aufgehoben werden. Diese Tiere zeigten das beste Ergebnis hinsichtlich des klinischen Verlaufes, der histologischen Veränderungen und der Reduktion der Keimzahlen, was auf einen Synergismus zwischen Wachstumsfaktor und monoklonalem Antikörper hinweist. Die Blockierung von $\text{TNF-}\alpha$ durch Pentoxifyllin hingegen verzögerte die Letalität nach Induktion der Pneumonie, verhinderte sie jedoch nicht. Anhand der im Vergleich zur Kontrollgruppe hundertfach erhöhten Keimzahlen ließ sich sogar ein negativer Einfluß von Pentoxifyllin auf den Verlauf der experimentellen *K. pneumoniae*-Pneumonie nachweisen. Die gleichzeitige Gabe von Pentoxifyllin und prophylaktischem G-CSF hatte ebenfalls keinen positiven Effekt auf klinischen Verlauf, Letalität und bakterieller Besiedlung von Lunge, Leber und Milz.

In vitro konnte hier nachgewiesen werden, daß G-CSF spezifisch an *K. pneumoniae* bindet und daß diese Bindung an mehrere Proteine mit einem Molekulargewicht von 41, 25 und 21 kDa erfolgt. Diese Bindung von G-CSF an *K. pneumoniae* hatte zwar keinen Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Keime, führte aber zu einer signifikant erhöhten Produktion des wichtigsten Virulenzfaktors, K2-KPS. Dies wiederum hatte in vitro eine signifikant verminderte Phagozytose der Bakterien durch neutrophile Granulozyten zur Folge mit der Konsequenz, daß signifikant weniger Bakterien durch neutro-

phile Granulozyten abgetötet wurden, wenn sie in der Gegenwart klinisch relevanter Mengen von G-CSF angezüchtet wurden.

Damit gelang es zum ersten Mal, die Bindung von G-CSF an ein klinisch relevantes gram-negatives Bakterium, *K. pneumoniae*, nachzuweisen und zu zeigen, daß diese Bindung in vitro zu einer erhöhten Produktion des wichtigsten Virulenzfaktors führt und in vivo zur Verschlechterung einer experimentellen Pneumonie durch erhöhte bakterielle Disseminierung, wenn G-CSF prophylaktisch vor Infektion eingesetzt wurde. Die weitere Untersuchung dieser Phänomene hinsichtlich einer möglichen Bindung von G-CSF auch an andere Bakterien könnte zu einer differenzierten supportiven Therapie bakterieller Infektionen mit G-CSF in nicht neutropenischen Patienten führen.

7. Literatur

1. Moore, M.A.S. 1991. The clinical use of colony stimulating factors. *Annu.Rev.Immunol.* 9:159-191.
2. Donta, S.T., P.Peduzzi, A.S.Cross, J.Sadoff, C.Haakenson, S.J.Cryz, Jr., C.Kauffman, S.Bradley, G.Gafford, D.Elliston, T.R.Beam, Jr., J.F.John, Jr., B.Ribner, R.Cantey, C.H.Welsh, R.T.Ellison, III, E.J.Young, R.J.Hamill, H.Leaf, R.M.H.Schein, M.Mulligan, C.Johnson, E.Abrutyn, J.M.Griffiss, R.Hamadeh, A.H.Eliasson, J.B.McClain, G.P.Melcher, J.W.Kelly, W.R.Byrne, M.Wallace, D.Amundson, B.Gumpert, D.Slagle, and The Federal Hyperimmune Immunoglobuline Trial Study Group. 1996. Immunoprophylaxis against *Klebsiella* and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J.Infect.Dis.* 174:537-543.
3. Mandine, E., M.-F.Salles, R.Zalish, M.Guenounou, and P.Smets. 1990. Murine monoclonal antibodies to *Klebsiella pneumoniae* protect against lethal endotoxemia and experimental infection with capsulated *K. pneumoniae*. *Infect.Immun.* 58:2828-2833.
4. Frasa, H., B.Benaissa-Trouw, L.Tavares, K.van Kessel, M.Poppelier, K.Kraaijeveld, and J.Verhoef. 1996. Enhanced protection by use of a combination of anticapsule and antilipopolysaccharide monoclonal antibodies against lethal *Escherichia coli* O18K5 infection in mice. *Infect.Immun.* 64:775-781.
5. Bartlett, J.G., P.O'Keefe, F.P.Tally, T.J.Louie, and S.L.Gorbach. 1986. Bacteriology of hospital-acquired pneumonia. *Arch.Intern.Med.* 146:868-871.
6. Bryan, C.S., K.L.Reynolds, and E.R.Brenner. 1983. Analysis of 1,186 episodes of gram-negative bacteremia in non-university hospitals: the effects of antimicrobial therapy. *Rev.Infect.Dis.* 5:629-638.
7. Cross, A., J.R.Allen, J.Burke, G.Ducel, A.Harris, J.John, D.Johnson, M.Lew, B.MacMillan, P.Meers, R.Skalova, R.Wenzel, and J.Tenney. 1983. Nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: review of recent trends. *Rev.Infect.Dis.* 5 (Suppl. 5):S837-S845.

8. de la Torre,M.G., J.Romero-Vivas, J.Martínez-Beltrán, A.Guerrero, M.Meseguer, and E.Bouza. 1985. Klebsiella bacteremia: An analysis of 100 episodes. *Rev.Infect.Dis.* 7:143-150.
9. Jarvis,W.R., V.P.Munn, A.K.Highsmith, D.H.Culver, and J.M.Hughes. 1985. The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect.Control* 6:68-74.
10. McGowan,J.E., Jr. 1985. Changing etiology of nosocomial bacteremia and fungemia and other hospital-acquired infections. *Rev.Infect.Dis.* 7 (Suppl. 3):S357-S370.
11. Montgomerie,J.Z. 1979. Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-acquired infections. *Rev.Infect.Dis.* 1:736-753.
12. Montgomerie,J.Z. and J.K.Ota. 1980. Klebsiella bacteremia. *Arch.Intern.Med.* 140:525-527.
13. Jay,S.J. 1983. Nosocomial pneumonia. *Nosocomial Infect.* 74:221-235.
14. Carpenter,J.L. 1990. Klebsiella pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev.Infect.Dis.* 12:672-682.
15. Jong,G.-M., T.-R.Hsiue, C.-R.Chen, H.-Y.Chang, and C.-W.Chen. 1995. Rapidly fatal outcome of bacteremic *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in alcoholics. *Chest* 107:214-217.
16. Sirot,J., C.Chanal, A.Petit, D.Sirot, R.Labia, and G.Gerbaud. 1988. *Klebsiella pneumoniae* and other enterobacteriaceae producing novel plasmid-mediated β -lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: epidemiologic studies. *Rev.Infect.Dis.* 10:850-859.
17. Jacoby,G.A. and G.L.Archer. 1991. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N.Engl.J.Med.* 324:601-612.

18. Jacoby, G.A. 1996. Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s. *Annu.Rev.Med.* 47:169-179.
19. Brun-Buisson, C., P.Legrand, A.Philippon, F.Montravers, M.Ansquer, and J.Duval. 1987. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* II:302-306.
20. MacKenzie, F.M., K.J.Forbes, T.Dorai-John, S.G.B.Amyes, and I.M.Gould. 1997. Emergence of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 350:783-783.
21. Meyer, K.S., C.Urban, J.A.Eagan, B.J.Berger, and J.J.Rahal. 1993. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late- generation cephalosporins. *Ann.Intern.Med.* 119:353-358.
22. Simoons-Smit, A.M., A.M.Verweij-van Vught, and D.M.Maclaren. 1986. The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. *J.Med.Microbiol.* 21:133-137.
23. Podschun, R. and U.Ullmann. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin.Microbiol.Rev.* 11:589-603.
24. Domenico, P., R.J.Salo, A.S.Cross, and B.A.Cunha. 1994. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect.Immun.* 62:4495-4499.
25. Trautmann, M., A.Ghandchi, T.Held, S.J.Cryz, Jr., and A.S.Cross. 1991. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of soluble *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide. *J.Microbiol.Methods* 13:305-313.
26. Held, T.K., C.Adamczik, M.Trautmann, and A.S.Cross. 1995. Effects of MICs and sub-MICs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 39:1093-1096.

27. Straus,D.C., D.L.Atkisson, and C.W.Garner. 1985. Importance of a lipopolysaccharide-containing extracellular toxic complex in infections produced by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect.Immun.* 50:787-795.
28. Straus,D.C. 1987. Production of an extracellular toxic complex by various strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect.Immun.* 55:44-48.
29. Ørskov,I. and M.A.Fife-Asbury. 1977. New *Klebsiella* capsular antigen, K82, and the deletion of five of those previously assigned. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 27:386-387.
30. Whitfield,C., M.B.Perry, L.L.MacLean, and S.H.Yu. 1992. Structural analysis of the O-antigen side chain polysaccharides in the lipopolysaccharides of *Klebsiella* serotypes O2(2a), O2(2a,2b), and O2(2a,2c). *J.Bacteriol.* 174:4913-4919.
31. Cryz,S.J., Jr., P.M.Mortimer, V.Mansfield, and R.Germanier. 1986. Seroepidemiology of *Klebsiella* bacteremic isolates and implications for vaccine development. *J.Clin.Microbiol.* 23:687-690.
32. Cryz,S.J., Jr. 1987. Progress in immunization against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella* spp. *Pathol.Immunopathol.Res.* 6:147-152.
33. Podschun,R., P.Heineken, U.Ullmann, and H.-G.Sonntag. 1986. Comparative investigations of *Klebsiella* species of clinical origin: plasmid patterns, biochemical reactions, antibiotic resistances and serotypes. *Zentralbl.Bakt.Hyg.A* 262:335-345.
34. Podschun,R., D.Sievers, A.Fischer, and U.Ullmann. 1993. Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. *J.Infect.Dis.* 168:1415-1421.
35. Tomás,J.M., V.J.Benedí, B.Ciurana, and J.Jofre. 1986. Role of capsule and O antigen in resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity. *Infect.Immun.* 54:85-89.

36. Held, T.K., M. Trautmann, and A.S. Cross. 1998. Lipopolysaccharid (LPS) hat keinen Einfluß auf die Letalität bei experimenteller *Klebsiella pneumoniae*-Infektion. *DGHM-Kongress Berlin, 4.-9.10.1998* Abstract Nummer 10.
37. Broug-Holub, E., G.B. Toews, J.F. van Iwaarden, R.M. Strieter, S.L. Kunkel, R. Paine, III, and T.J. Standiford. 1997. Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine *Klebsiella pneumoniae*: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. *Infect. Immun.* 65:1139-1146.
38. Laichalk, L.L., S.L. Kunkel, R.M. Strieter, J.M. Danforth, M.B. Bailie, and T.J. Standiford. 1996. Tumor necrosis factor mediates lung antibacterial host defense in murine *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 64:5211-5218.
39. Laichalk, L.L., K.A. Bucknell, G.B. Huffnagle, J.M. Wilkowski, T.A. Moore, R.J. Romanelli, and T.J. Standiford. 1998. Intrapulmonary delivery of tumor necrosis factor agonist peptide augments host defense in murine gram-negative bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* 66:2822-2826.
40. Blanchard, D.K., J.Y. Djeu, T.W. Klein, H. Friedman, and W.E. Stewart, II. 1988. Protective effects of tumor necrosis factor in experimental *Legionella pneumophila* infections of mice via activation of PMN function. *J. Leukoc. Biol.* 43:429-435.
41. Chen, W., E.A. Havell, and A.G. Harmsen. 1992. Importance of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in host resistance against *Pneumocystis carinii* infection. *Infect. Immun.* 60:1279-1284.
42. Nakano, Y., K. Onozuka, Y. Terada, H. Shinomiya, and M. Nakano. 1990. Protective effect of recombinant tumor necrosis factor- α in murine salmonellosis. *J. Immunol.* 144:1935-1941.
43. Hershman, M.J., J.D. Pietsch, L. Trachtenberg, T.H.R. Mooney, R.E. Shields, and G. Sonnenfeld. 1989. Protective effects of recombinant human tumour necrosis

- factor α and interferon γ against surgically simulated wound infections in mice. *Br.J.Surg.* 76:1282-1286.
44. Nelson,S., C.Nakamura, J.Shellito, G.Bagby, and W.Summer. 1900. Intratracheal gamma-interferon enhances pulmonary host defenses against *Pseudomonas aeruginosa*. *Am.Rev.Respir.Dis.* 130:A337 (Abstr.).
 45. Greenberger,M.J., R.M.Strieter, S.L.Kunkel, J.M.Danforth, L.L.Laichalk, D.C.McGillicuddy, and T.J.Standiford. 1996. Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in murine *Klebsiella pneumoniae*. *J.Infect.Dis.* 173:159-165.
 46. O'Brien,A.D., T.J.Standiford, K.A.Bucknell, S.E.Wilcoxon, and R.Paine, III. 1999. Role of alveolar epithelial cell intercellular adhesion molecule-1 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *Am.J.Physiol.* 276:L961-L970.
 47. Tsai,W.C., R.M.Strieter, D.A.Zisman, J.M.Wilkowski, K.A.Bucknell, G.-H.Chen, and T.J.Standiford. 1997. Nitric oxide is required ro effective innate immunity against *Klebsiella pneumoniae*. *Infect.Immun.* 65:1870-1875.
 48. Kim,K.S., J.H.Kang, A.S.Cross, B.Kaufman, W.Zollinger, and J.Sadoff. 1988. Functional activities of monoclonal antibodies to the O side chain of *Escherichia coli* lipopolysaccharides in vitro and in vivo. *J.Infect.Dis.* 157:47-53.
 49. Schiff,D.E., C.A.Wass, S.J.Cryz, Jr., A.S.Cross, and K.S.Kim. 1993. Estimation of protective levels of anti-O-specific lipopolysaccharide immunoglobulin G antibody against experimental *Escherichia coli* infection. *Infect.Immun.* 61:975-980.
 50. Meno,Y. and K.Amano. 1990. Morphological evidence for penetration of anti-O antibody through the capsule of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect.Immun.* 58:1421-1428.
 51. Held,T.K., N.R.M.Jendrike, T.Rukavina, R.Podschun, and M.Trautmann. 2000. Binding to and opsonophagocytic activity of O-antigen-specific monoclonal an-

- tibodies against encapsulated and nonencapsulated *Klebsiella pneumoniae* serotype O1 strains. *Infect.Immun.* 68:2402-2409.
52. Rukavina,T., B.Ticac, M.Susa, N.Jendrike, S.Jonjic, P.Lucin, R.Marre, M.Doric, and M.Trautmann. 1997. Protective effect of antilipopolysaccharide monoclonal antibody in experimental *Klebsiella* infection. *Infect.Immun.* 65:1754-1760.
 53. Trautmann,M., S.J.Cryz, Jr., J.C.Sadoff, and A.S.Cross. 1988. A murine monoclonal antibody against *Klebsiella* capsular polysaccharide is opsonic in vitro and protects against experimental *Klebsiella pneumoniae* infection. *Microb.Pathogen.* 5:177-187.
 54. Held,T.K., M.Trautmann, M.E.A.Mielke, H.Neudeck, S.J.Cryz, Jr., and A.S.Cross. 1992. Monoclonal antibody against *Klebsiella* capsular polysaccharide reduces severity and hematogenic spread of experimental *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infect.Immun.* 60:1771-1778.
 55. Niskanen,E. 1991. Hematopoietic growth factors in clinical hematology. *Ann.Med.* 23:615-624.
 56. Khwaja,A. and D.C.Linch. 1992. Clinical applications of haemopoietic growth factors. *Leuk.Lymphoma* 7 Suppl:69-72.
 57. Nemunaitis,J., J.D.Meyers, C.D.Buckner, K.Shannon-Dorcy, M.Mori, H.Shulman, J.A.Bianco, C.S.Higano, E.Groves, R.Storb, J.Hansen, F.R.Appelbaum, and J.W.Singer. 1991. Phase I trial of recombinant human macrophage colony-stimulating factor in patients with invasive fungal infections. *Blood* 78:907-913.
 58. Bodey,G.P., M.Buckley, Y.S.Sathe, and E.J.Freireich. 1966. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann.Intern.Med.* 64:328-340.
 59. Bonilla,M.A., A.P.Gillio, M.Ruggeiro, N.A.Kernan, J.A.Brochstein, M.Abboud, L.Fumagalli, M.Vincent, J.L.Gabrilove, K.Welte, L.M.Souza, and R.J.O'Reilly.

1989. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia in patients with congenital agranulocytosis. *N.Engl.J.Med.* 320:1574-1580.
60. Crawford,J., H.Ozer, R.Stoller, D.Johnson, G.Lyman, I.Tabbara, M.Kris, J.Grous, V.Picozzi, G.Rausch, R.Smith, W.Gradishar, A.Yahanda, M.Vincent, M.Stewart, and J.Glaspy. 1991. Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small-cell lung cancer. *N.Engl.J.Med.* 325:164-170.
 61. Gabrilove,J.L., A.Jakubowski, H.Scher, C.Sternberg, G.Wong, J.Grous, A.Yagoda, K.Fain, J.A.S.Moore, B.Clarkson, H.F.Oettgen, K.Alton, K.Welte, and L.Souza. 1988. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy for transitional-cell carcinoma of the urothelium. *N.Engl.J.Med.* 318:1414-1422.
 62. Maher,D.W., G.J.Lieschke, M.Green, J.Bishop, R.Stuart-Harris, M.Wolf, W.P.Sheridan, R.F.Kefford, J.Cebon, I.Olver, J.McKendrick, G.Toner, K.Bradstock, M.Lieschke, S.Cruickshank, D.K.Tomita, E.W.Hoffman, R.M.Fox, and G.Morstyn. 1994. Filgrastim in patients with chemotherapy-induced febrile neutropenia. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann.Intern.Med.* 121:492-501.
 63. Hartmann,L.C., L.K.Tschetter, T.M.Habermann, L.P.Ebbert, P.S.Johnson, J.A.Mailliard, R.Levitt, V.J.Suman, T.E.Witzig, H.S.Wieand, L.L.Miller, and C.G.Moertel. 1997. Granulocyte colony-stimulating factor in severe chemotherapy-induced afebrile neutropenia. *N.Engl.J.Med.* 336:1776-1780.
 64. Geller,R.B. 1996. Use of cytokines in the treatment of acute myelocytic leukemia: a critical review. *J.Clin.Oncol.* 14:1371-1382.
 65. Giles,F.J. 1998. Monocyte-macrophages, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and prolonged survival among patients with acute myeloid leukemia and stem cell transplants. *Clin.Infect.Dis.* 26:1282-1289.

66. Weston,B., R.F.Todd III, R.Axtell, K.Balazovich, J.Stewart, B.J.Locey, L.Mayo-Bond, P.Loos, R.Hutchinson, and L.A.Boxer. 1991. Severe congenital neutropenia: Clinical effects and neutrophil function during treatment with granulocyte colony-stimulating factor. *J.Lab.Clin.Med.* 117:282-290.
67. Donadieu,J., P.Boutard, E.Bernatowska, G.Tchernia, G.Couillaud, N.Philippe, and E.Le Gall. 1997. A european phase II study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) in the treatment of severe chronic neutropenia in children. *Eur.J.Pediatr.* 156:693-700.
68. Welte,K., C.Zeidler, A.Reiter, W.Müller, E.Odenwald, L.Souza, and H.Riehm. 1990. Differential effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in children with severe congenital neutropenia. *Blood* 75:1056-1063.
69. Muroi,K., M.Ito, R.Sasaki, T.Suda, S.Sakamoto, and Y.Miura. 1989. Treatment of drug-induced agranulocytosis with granulocyte-colony stimulating factor. *Lancet* I:55-55.
70. Jakubowski,A.A., L.Souza, F.Kelly, K.Fain, D.Budman, B.Clarkson, M.A.Bonilla, M.A.S.Moore, and J.Gabrilove. 1989. Effects of human granulocyte colony-stimulating factor in a patient with idiopathic neutropenia. *N.Engl.J.Med.* 320:38-42.
71. Metcalf,D. 1971. Acute antigen-induced elevation of serum colony stimulating factor (CFS) levels. *Immunology* 21:427-436.
72. Vellenga,E., A.Rambaldi, T.J.Ernst, D.Ostapovicz, and J.D.Griffin. 1988. Independent regulation of M-CSF and G-CSF gene expression in human monocytes. *Blood* 71:1529-1532.
73. Lenhoff,S. and T.Olofsson. 1996. Cytokine regulation of GM-CSF and G-CSF secretion by human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC). *Cytokine* 8:702-709.

74. Vellenga,E., B.van der Vinne, J.T.M.de Wolf, and M.R.Halie. 1991. Simultaneous expression and regulation of G-CSF and IL-6 mRNA in adherent human monocytes and fibroblasts. *Br.J.Haematol.* 78:14-18.
75. Leizer,T., J.Cebon, J.E.Layton, and J.A.Hamilton. 1990. Cytokine regulation of colony-stimulating factor production in cultured human synovial fibroblasts: I. Induction of GM-CSF and G-CSF production by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Blood* 76:1989-1996.
76. Seelentag,W.K., J.-J.Mermod, R.Montesano, and P.Vassalli. 1987. Additive effects of interleukin 1 and tumour necrosis factor- α on the accumulation of the three granulocyte and macrophage colony-stimulating factor mRNAs in human endothelial cells. *EMBO J.* 6:2261-2265.
77. Tanaka,T., S.Akira, K.Yoshida, M.Umemoto, Y.Yoneda, N.Shirafuji, H.Fujiwara, S.Suematsu, N.Yoshida, and T.Kishimoto. 1995. Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* 80:353-361.
78. Aoki,Y., D.Hirano, H.Kodama, Y.Nishi, and M.Nakamura. 1998. Stimulation of G-CSF gene expression in the macrophage cell line by contact with extracellular matrix proteins and a pre-B leukaemia cell line. *Cytokine* 10:596-602.
79. Dransfield,I., A.-M.Buckle, J.S.Savill, A.Mcdowall, C.Haslett, and N.Hogg. 1994. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc-gamma-RIII) expression. *J.Immunol.* 153:1254-1263.
80. Dancey,J.T., K.A.Deubelbeiss, L.A.Harker, and C.A.Finch. 1976. Neutrophil kinetics in man. *J.Clin.Invest.* 58:705-715.
81. Savill,J.S., A.H.Wyllie, J.E.Henson, M.J.Walport, P.M.Henson, and C.Haslett. 1989. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophils leads to its recognition by macrophages. *J.Clin.Invest.* 83:865-875.

82. Colotta, F., F. Re, N. Polentarutti, S. Sozzani, and A. Mantovani. 1992. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80:2012-2020.
83. Keel, M., U. Ungethüm, U. Steckholzer, E. Niederer, T. Hartung, O. Trentz, and W. Ertel. 1997. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood* 90:3356-3363.
84. Lieschke, G.J. and A.W. Burgess. 1992. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *N.Engl.J.Med.* 327:99-106.
85. Zhang, P., G.J. Bagby, D.A. Stoltz, W.R. Summer, and S. Nelson. 1998. Enhancement of peritoneal leukocyte function by granulocyte colony-stimulating factor in rats with abdominal sepsis. *Crit.Care Med.* 26:315-321.
86. Kapp, A. and G. Zeck-Kapp. 1990. Activation of the oxidative metabolism in human polymorphonuclear neutrophilic granulocytes: the role of immunomodulating cytokines. *J.Invest.Dermatol.* 95:94S-99S.
87. Zeck-Kapp, G., A. Kapp, and U.N. Riede. 1989. Activation of human polymorphonuclear neutrophilic granulocytes by immuno-modulating cytokines: an ultrastructural study. *Immunobiol.* 179:44-55.
88. Nathan, C.F. 1989. Respiratory burst in adherent human neutrophils: Triggering by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G. *Blood* 73:301-306.
89. Khwaja, A., J.E. Carver, and D.C. Linch. 1992. Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte CSF, and tumor necrosis factor α in the priming of the neutrophil respiratory burst. *Blood* 79:745-753.
90. Niwa, M., A.-E.L. Yousif, K.-I. Kohno, Y. Kanamori, M. Matsuno, A. Abe, and T. Uematsu. 1996. The loss of recombinant human granulocyte colony-

- stimulating factor and recombinant human TNF- α priming effects on the superoxide-generating response in exudated neutrophils is associated with a decrease in their receptor affinities. *J.Immunol.* 157:4147-4153.
91. Balazovich, K.J., H.I. Almeida, and L.A. Boxer. 1991. Recombinant human G-CSF and GM-CSF prime human neutrophils for superoxide production through different signal transduction mechanisms. *J.Lab.Clin.Med.* 118:576-584.
 92. Yuo, A., S. Kitagawa, A. Ohsaka, M. Saito, and F. Takaku. 1990. Stimulation and priming of human neutrophils by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Qualitative and quantitative differences. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 171:491-497.
 93. Larsen, A., T. Davis, B.M. Curtis, S. Gimpel, J.E. Sims, D. Cosman, L. Park, E. Sorensen, C.J. March, and C.A. Smith. 1990. Expression cloning of a human granulocyte colony-stimulating factor receptor: A structural mosaic of hematopoietin receptor, immunoglobulin, and fibronectin domains. *J.Exp.Med.* 172:1559-1570.
 94. Knight, K.R., G. Vairo, and J.A. Hamilton. 1992. Regulation of pinocytosis in murine macrophages by colony-stimulating factors and other agents. *J.Leukoc.Biol.* 51:350-359.
 95. Sorokin, S.P., N.A. McNelly, and R.F. Hoyt, Jr. 1992. Macrophage development: IV. Effects of blood factors on macrophages from prenatal rat lung cultures. *Anat.Rec.* 233:415-428.
 96. Shirai, R., J. Kadota, K. Tomono, K. Ogawa, K. Iida, K. Kawakami, and S. Kohno. 1997. Protective effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in a granulocytopenic mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection through enhanced phagocytosis and killing by alveolar macrophages through priming tumour necrosis factor alpha (TNF- α) production. *Clin.Exp.Immunol.* 109:73-79.

97. Bussolino,F., M.Ziche, J.M.Wang, D.Alessi, L.Morbidelli, O.Cremona, A.Bosia, P.C.Marchisio, and A.Mantovani. 1991. In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J.Clin.Invest.* 87:986-995.
98. Geissler,K., M.Harrington, C.Srivastava, T.Leemhuis, G.Tricot, and H.E.Broxmeyer. 1989. Effects of recombinant human colony-stimulating factors (CSF) (granulocyte-macrophage CSF, granulocyte CSF, and CSF-1) on human monocyte/macrophage differentiation. *J.Immunol.* 143:140-146.
99. Deetjen,C., S.Frede, M.Smolny, M.Seibel, W.Schobersberger, and G.Hoffmann. 1999. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells by granulocyte-colony stimulating factor in vitro. *Immunopharmacology* 43:23-30.
100. Wanner,G.A., V.Stockle, M.Bauer, M.D.Menger, and B.Vollmar. 1999. Differential gene expression of CINC, NOS II, and ICAM-1 in endotoxemic liver cells by rG-CSF. *Langenbeck's Arch.Surg.* 384:216-221.
101. Nelson,S., W.Summer, G.Bagby, C.Nakamura, L.Stewart, G.Lipscomb, and J.Andresen. 1991. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Enhances Pulmonary Host Defences in Normal and Ethanol-Treated Rats. *J.Infect.Dis.* 164:901-906.
102. Hebert,J.C., M.O'Reilly, and R.L.Gamelli. 1990. Protective effect of recombinant human granulocyte colony- stimulating factor against pneumococcal infections in splenectomized mice. *Arch.Surg.* 125:1075-1078.
103. Lorenz,W., K.-P.Reimund, F.Weitzel, I.Celik, M.Kurnatowski, C.Schneider, W.Mannheim, A.Heiske, K.Neumann, H.Sitter, and M.Rothmund. 1994. Granulocyte colony-stimulating factor prophylaxis before operation protects against lethal consequences of postoperative peritonitis. *Surgery* 116:925-934.
104. Matsumoto,M., S.Matsubara, T.Matsuno, M.Tamura, K.Hattori, H.Nomura, M.Ono, and T.Yokota. 1987. Protective effect of human granulocyte colony-stimulating factor on microbial infection in neutropenic mice. *Infect.Immun.* 55:2715-2720.

105. Wakiyama,H., S.Tsuru, N.Hata, M.Shinomiya, N.Shinomiya, M.Noritake, Y.Umezawa, and M.Rokutanda. 1993. Therapeutic effect of granulocyte colony-stimulating factor and cephem antibiotics against experimental infections in neutropenic mice induced by cyclophosphamide. *Clin.Exp.Immunol.* 92:218-224.
106. O'Reilly,M., G.M.Silver, D.G.Greenhalgh, R.L.Gamelli, J.H.Davis, and J.C.Hebert. 1992. Treatment of intra-abdominal infection with granulocyte colony-stimulating factor. *J.Trauma* 33:679-682.
107. Yasuda,H., Y.Ajiki, T.Shimozato, M.Kasahara, H.Kawada, M.Iwata, and K.Shimizu. 1990. Therapeutic Efficacy of Granulocyte Colony-Stimulating Factor Alone and in Combination with Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Mice. *Infect.Immun.* 58:2502-2509.
108. Lieschke,G.J., D.Grail, G.Hodgson, D.Metcalf, E.Stanley, C.Cheers, K.J.Fowler, S.Basu, Y.F.Zhan, and A.R.Dunn. 1994. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 84:1737-1746.
109. Roilides,E., K.Uhlig, D.Venzon, P.A.Pizzo, and T.J.Walsh. 1992. Neutrophil oxidative burst in response to Blastozoonidia and Pseudohyphae of *Candida albicans*: Augmentation by granulocyte colony-stimulating factor and interferon- γ . *J.Infect.Dis.* 166:668-673.
110. Zhang,P., G.J.Bagby, D.A.Stoltz, J.A.Spitzer, W.R.Summer, and S.Nelson. 1997. Modulation of the lung host response by granulocyte colony-stimulating factor in rats challenged with intrapulmonary endotoxin. *Shock* 7:193-199.
111. Trautmann,M., K.Vogt, C.Hammack, and A.S.Cross. 1994. A murine monoclonal antibody defines a unique epitope shared by *Klebsiella* lipopolysaccharides. *Infect.Immun.* 62:1282-1288.

112. Held,T.K., M.E.A.Mielke, M.Chedid, M.Unger, M.Trautmann, D.Huhn, and A.S.Cross. 1998. Granulocyte colony-stimulating factor worsens the outcome of experimental *Klebsiella pneumoniae* pneumonia through direct interaction with the bacteria. *Blood* 91:2525-2535.
113. Mielke,M.E.A., I.B.Autenrieth, and T.K.Held. 1998. The immune response in mice challenged with bacterial infections. *In Immunology of Infection*. S.H.E.Kaufmann and D.Kabelitz, editors. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. 313-364.
114. Sidberry,H., B.Kaufman, D.C.Wright, and J.Sadoff. 1985. Immunochemical analysis by monoclonal antibodies of bacterial lipopolysaccharides after transfer to nitrocellulose. *J.Immunol.Methods* 76:299-305.
115. Tsomides,T.J., B.D.Walker, and H.N.Eisen. 1991. An optimal viral peptide recognized by CD8⁺ T cells binds very tightly to the restricting class I major histocompatibility complex protein on intact cells but not to the purified class I protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:11276-11280.
116. Markwell,M.A. 1982. A new solid-state reagent to iodinate proteins. I. Conditions for the efficient labeling of antiserum. *Anal.Biochem.* 125:427-432.
117. Hulme,E.C. 1990. Receptor-binding studies, a brief outline. *In Receptor Biochemistry, A Practical Approach*. E.C.Hulme, editor. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo. 303-315.
118. Cross,A.S., G.H.Lowell, J.Palmblad, J.C.Sadoff, L.Young, and M.Berger. 1985. Mechanism of priming of human neutrophils by a soluble lymphoblastoid cell factor. *J.Immunol.* 135:2074-2083.
119. Schermer,S. 1958. Blut und blutbildende Organe. *In Pathologie der Laboratoriumstiere*. P.Cohrs, R.Jaffé, and H.Meessen, editors. Springer, Berlin. 199-206.
120. Hagemann,E. and G.Schmidt. 1960. Ratte und Maus. Versuchstiere in der Forschung. Walter de Gruyter, Berlin. 239-240 pp.

121. Suzuki,A., T.Takahashi, Y.Okuno, S.Seko, Y.Fukuda, K.Nakamura, M.Fukumoto, Y.Konaka, and H.Imura. 1993. Liver damage in patients with colony-stimulating factor-producing tumors. *Am.J.Med.* 94:125-132.
122. Zhang,F., A.zur Hausen, R.Hoffmann, M.Grewe, and K.Decker. 1994. Rat liver macrophages express the 55 kDa tumor necrosis factor receptor: modulation by interferon- γ , lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- α . *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* 375:249-254.
123. Hoffmann,R., M.Grewe, H.-C.Estler, A.Schulze-Specking, and K.Decker. 1994. Regulation of tumor necrosis factor- α -mRNA synthesis and distribution of tumor necrosis factor- α -mRNA synthesizing cells in rat liver during experimental endotoxemia. *J.Hepatol.* 20:122-128.
124. Alexander,H.R., B.C.Sheppard, J.C.Jensen, H.N.Langstein, C.M.Buresh, D.Venzon, E.C.Walker, D.L.Fraker, M.C.Stovroff, and J.A.Norton. 1991. Treatment with recombinant human tumor necrosis factor-alpha protects rats against the lethality, hypotension, and hypothermia of gram-negative sepsis. *J.Clin.Invest.* 88:34-39.
125. Echtenacher,B., W.Falk, D.N.Männel, and P.H.Krammer. 1990. Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J.Immunol.* 145:3762-3766.
126. Doherty,G.M., J.C.Jensen, R.Alexander, C.M.Buresh, and J.A.Norton. 1991. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery* 110:192-198.
127. Han,J., P.Thompson, and B.Beutler. 1990. Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signalling pathway. *J.Exp.Med.* 172:391-394.
128. Roberts,P.J., K.L.Yong, A.Khwaja, B.V.Johnson, A.R.Pizzey, J.E.Carver, I.E.Addison, and D.C.Linch. 1993. Pentoxifylline at clinically achievable levels inhibits FMLP-induced neutrophil responses, but not priming, upregulation of

- cell-adhesion molecules, or migration induced by GM-CSF. *Eur.J.Haematol.* 50:1-10.
129. Zabel,P. and F.U.Schade. 1993. Therapiestrategien gegen Mediatoren beim septischen Schock. *Immun.Infekt.* 21:45-50.
 130. Porat,R., B.D.Clark, S.M.Wolff, and C.A.Dinarelo. 1991. Enhancement of growth of virulent strains of *Escherichia coli* by interleukin-1. *Science* 254:430-432.
 131. Petros,W.P. 1992. Pharmacokinetics and administration of colony-stimulating factors. *Pharmacotherapy* 12(2 Pt 2):32S-38S.
 132. Hollingshead,L.M. and K.L.Goa. 1991. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF). A review of its pharmacological properties and prospective role in neutropenic conditions. *Drugs* 42:300-330.
 133. Cebon,J., J.E.Layton, D.Maher, and G.Morstyn. 1994. Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection. *Br.J.Haematol.* 86:265-274.
 134. Cross,A., L.Asher, M.Seguin, L.Yuan, N.Kelly, C.Hammack, J.Sadoff, and P.Gemski, Jr. 1995. The importance of a lipopolysaccharide-initiated, cytokine-mediated host defense mechanism in mice against extraintestinally invasive *Escherichia coli*. *J.Clin.Invest.* 96:676-686.
 135. Rapoport,A.P., C.N.Abboud, and J.F.DiPersio. 1992. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): receptor biology, signal transduction, and neutrophil activation. *Blood Rev.* 6:43-57.
 136. Fukunaga,R., Y.Seto, S.Mizushima, and S.Nagata. 1990. Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:8702-8706.

137. Zsebo,K.M., A.M.Cohen, D.C.Murdock, T.C.Boone, H.Inoue, V.R.Chazin, D.Hines, and L.M.Souza. 1986. Recombinant human granulocyte colony stimulating factor: molecular and biological characterization. *Immunobiol.* 172:175-184.
138. Pojda,Z., K.Tanaka, Y.Aoki, and A.Tsuboi. 1992. In vivo and in vitro interaction between Interleukin 6 and granulocyte colony-stimulating factor in the regulation of murine hematopoiesis. *Exp.Hematol.* 20:874-878.
139. Uchida,T. and A.Yamagiwa. 1992. Kinetics of rG-CSF-induced neutrophilia in mice. *Exp.Hematol.* 20:152-155.
140. Lister,P.D., M.J.Gentry, and L.C.Preheim. 1993. Granulocyte colony-stimulating factor protects control rats but not ethanol-fed rats from fatal pneumococcal pneumonia. *J.Infect.Dis.* 168:922-926.
141. Freeman,B.D., Z.Quezado, F.Zeni, C.Natanson, R.L.Danner, S.Banks, M.Quezado, Y.Fitz, J.Bacher, and P.Q.Eichacker. 1997. rG-CSF reduces endotoxemia and improves survival during *E. coli* pneumonia. *J.Appl.Physiol.* 83:1467-1475.
142. Eichacker,P.Q., Y.Waisman, C.Natanson, A.Farese, W.D.Hoffman, S.M.Banks, and T.J.MacVittie. 1994. Cardiopulmonary effects of granulocyte colony-stimulating factor in a canine model of bacterial sepsis. *J.Appl.Physiol.* 77:2366-2373.
143. Matsumoto,M., S.Matsubara, and T.Yokota. 1991. Effect of combination therapy with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF) and antibiotics in neutropenic mice unresponsive to antibiotics alone. *J.Antimicrob.Chemother.* 29:447-453.
144. Serushago,B.A., Y.Yoshikai, T.Handa, M.Mitsuyama, K.Muramori, and K.Nomoto. 1992. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) on murine resistance against *Listeria monocytogenes*. *Immunology* 75:475-480.

145. Villa,P., C.L.Shaklee, C.Meazza, D.Agnello, P.Ghezzi, and G.Senaldi. 1998. Granulocyte colony-stimulating factor and antibiotics in the prophylaxis of a murine model of polymicrobial peritonitis and sepsis. *J.Infect.Dis.* 178:471-477.
146. Buisman,A.-M., J.A.M.Langermans, and R.van Furth. 1996. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on the course of infection with gram-positive bacteria in mice during granulocytopenia induced by sublethal irradiation or cyclophosphamide. *J.Infect.Dis.* 174:417-421.
147. Patton,J.H., Jr., S.P.Lyden, N.Ragsdale, M.A.Croce, T.C.Fabian, and K.G.Proctor. 1998. Granulocyte colony-stimulating factor improves host defense to resuscitated shock and polymicrobial sepsis without provoking generalized neutrophil-mediated damage. *J.Trauma Inj.Infect.Crit.Care* 44:750-759.
148. Hustinx,W., B.Benaissa-Trouw, K.van Kessel, J.Kuenen, L.Tavares, K.Kraaijeveld, J.Verhoef, and A.Hoepelman. 1997. Granulocyte colony-stimulating factor enhances protection by anti-K1 capsular IgM antibody in murine *Escherichia coli* sepsis. *Eur.J.Clin.Invest.* 27:1044-1048.
149. Haberstroh,J., K.Wiese, A.Geist, G.B.Dursunoglu, C.Gippner-Steppert, M.Jochum, and B.-U.von Specht. 1998. Effect of delayed treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on survival and plasma cytokine levels in a non-neutropenic porcine model of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *Shock* 9:128-134.
150. DeMarsh,P.L., G.I.Wells, T.F.Lewandowski, P.K.Bhatnagar, and E.J.Ostovic. 1996. Effect of SK&F 107647, a novel hemoregulatory peptide, M-CSF or G-CSF in the rat fibrin-thrombin clot model of gram-negative and gram-positive sepsis. *96th General Meeting of the American Society for Microbiology, May 19-23.Abstract E-1.*
151. Karzai,W., B.U.von Specht, C.Parent, J.Haberstroh, K.Wollersen, C.Natanson, S.M.Banks, and P.Q.Eichacker. 1999. G-CSF during *Escherichia coli* versus *Staphylococcus aureus* pneumonia in rats has fundamentally different and opposite effects. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 159:1377-1382.

152. Rao,R., R.A.Prinz, G.B.Kazantsev, D.Hecht, P.Gattuso, H.K.Jacobs, G.Djuricin, and M.Castelli. 1996. Effects of granulocyte colony-stimulating factor in severe pancreatitis. *Surgery* 119:657-663.
153. Roilides,E., T.J.Walsh, P.A.Pizzo, and M.Rubin. 1991. Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. *J.Infect.Dis.* 163:579-583.
154. Østergaard,C., T.Benfield, B.Gesser, A.Kharazmi, N.Frimodt-Møller, F.Espersen, and J.D.Lundgren. 1999. Pretreatment with granulocyte colony-stimulating factor attenuates the inflammatory response but not the bacterial load in cerebrospinal fluid during experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Infect.Immun.* 67:3430-3436.
155. Kullberg,B.J., M.G.Netea, J.H.A.J.Curfs, M.Keuter, J.F.G.M.Meis, and J.W.M.van der Meer. 1998. Recombinant murine granulocyte colony-stimulating factor protects against acute disseminated *Candida albicans* infection in nonneutropenic mice. *J.Infect.Dis.* 177:175-181.
156. Toki,S., K.Hiromatsu, Y.Aoki, M.Makino, and Y.Yoshikai. 1997. Protective effects of granulocyte colony-stimulating factor on endotoxin shock in mice with retrovirus-induced immunodeficiency syndrome. *Cytokine* 9:781-786.
157. Weiss,M., L.L.Moldawer, and E.M.Schneider. 1999. Granulocyte colony-stimulating factor to prevent the progression of systemic nonresponsiveness in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Blood* 93:425-439.
158. Cross,A.S., J.C.Sadoff, N.Kelly, E.Bernton, and P.Gemski. 1989. Pretreatment with recombinant murine tumor necrosis factor α /cachectin and murine interleukin 1 α protects mice from lethal bacterial infection. *J.Exp.Med.* 169:2021-2027.
159. Grünewald,T., W.Schüler-Maué, and B.Ruf. 1993. Interleukin-8 and granulocyte colony-stimulating factor in bronchoalveolar lavage fluid and plasma of human

- immunodeficiency virus-infected patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia, bacterial pneumonia, or tuberculosis. *J.Infect.Dis.* 168:1077-1078.
160. Kolls,J.K., S.Nelson, and W.R.Summer. 1993. Recombinant cytokines and pulmonary host defense. *Am.J.Med.Sci.* 306:330-335.
 161. Salkowski,C.A., G.R.Detore, and S.N.Vogel. 1997. Lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A differentially regulate interleukin-12, gamma interferon, and interleukin-10 mRNA production in murine macrophages. *Infect.Immun.* 65:3239-3247.
 162. Salkowski,C.A., G.Detore, A.Franks, M.C.Falk, and S.N.Vogel. 1998. Pulmonary and hepatic gene expression following cecal ligation and puncture: monophosphoryl lipid A prophylaxis attenuates sepsis-induced cytokine and chemokine expression and neutrophil inflammation. *Infect.Immun.* 66:3569-3578.
 163. Henricson,B.E., W.R.Benjamin, and S.N.Vogel. 1990. Differential cytokine induction by doses of lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A that result in equivalent early endotoxin tolerance. *Infect.Immun.* 58:2429-2437.
 164. Cross,A.S., S.M.Opal, J.C.Sadoff, and P.Gemski. 1993. The choice of bacteria in animal models of sepsis. *Infect.Immun.* 61:2741-2747.
 165. Opal,S.M., J.W.Jhung, J.C.Keith, Jr., S.J.Goldman, J.E.Palardy, and N.A.Parejo. 1999. Additive effects of human recombinant interleukin-11 and granulocyte colony-stimulating factor in experimental gram-negative sepsis. *Blood* 93:3467-3472.
 166. Serizawa,I., K.Amano, H.Ishii, T.Ichikawa, M.Kusaka, T.Taguchi, N.Kiyokawa, and J.Fujimoto. 2000. Long-term overexpression of human granulocyte colony-stimulating factor in transgenic mice: persistent neutrophilia with no increased mortality for more than one year. *Cytokine* 12:630-635.
 167. Pollmächer,T., C.Korth, W.Schreiber, D.Hermann, and J.Mullington. 1996. Effects of repeated administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-

- CSF) on neutrophil counts, plasma cytokine, and cytokine receptor levels. *Cytokine* 8:799-803.
168. Pollmächer, T., C. Korth, J. Mullington, W. Schreiber, J. Sauer, H. Vedder, C. Galanos, and F. Holsboer. 1996. Effects of granulocyte colony-stimulating factor on plasma cytokine and cytokine receptor levels and on the in vivo host response to endotoxin in healthy men. *Blood* 87:900-905.
 169. Pajkrt, D., A. Manten, T. van der Poll, M. M. C. Tiel-van Buul, J. Jansen, J. W. ten Cate, and S. J. H. van Deventer. 1997. Modulation of cytokine release and neutrophil function by granulocyte colony-stimulating factor during endotoxemia in humans. *Blood* 90:1415-1424.
 170. Vollmar, B., S. Messner, G. A. Wanner, T. Hartung, and M. D. Menger. 1997. Immunomodulatory action of G-CSF in a rat model of endotoxin-induced liver injury: in intravital microscopic analysis of Kupffer cell and leukocyte response. *J. Leukoc. Biol.* 62:710-718.
 171. Dunzendorfer, S., P. Schratzberger, N. Reinisch, C. M. Kähler, and C. J. Wiedermann. 1997. Pentoxifylline differentially regulates migration and respiratory burst activity of the neutrophil. *Ann. N Y Acad. Sci.* 832:330-340.
 172. Amura, C. R., P. A. Fontán, N. Sanjuan, and D. O. Sordelli. 1994. The effect of treatment with interleukin-1 and tumor necrosis factor on *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in a granulocytopenic mouse model. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 73:261-266.
 173. Whiteside, T. L. 1994. Cytokine measurements and interpretation of cytokine assays in human disease. *J. Clin. Immunol.* 14:327-339.
 174. Cavaillon, J.-M., C. Munoz, C. Fitting, B. Misset, and J. Carlet. 1992. Circulating cytokines: the tip of the iceberg? *Circ. Shock* 38:145-152.
 175. Dinarello, C. A. and J. G. Cannon. 1993. Cytokine measurements in septic shock (editorial). *Ann. Intern. Med.* 119:853-854.

176. Casey,L.C., R.A.Balk, and R.C.Bone. 1993. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann.Intern.Med.* 119:771-778.
177. Hierholzer,C., E.Kelly, V.Lyons, T.R.Billiar, and D.J.Tweardy. 1996. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) instillation into the lung results in neutrophil recruitment and lung damage. *Surgical Forum* 47:118-120.
178. Wang,J.M., Z.G.Chen, S.Colella, M.A.Bonilla, K.Welte, C.Bordignon, and A.Mantovani. 1988. Chemotytic activity of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 72:1456-1460.
179. Hierholzer,C., E.Kelly, V.Lyons, E.Roedling, P.Davies, T.R.Billiar, and D.J.Tweardy. 1998. G-CSF instillation into rat lungs mediates neutrophil recruitment, pulmonary edema, and hypoxia. *J.Leukoc.Biol.* 63:169-174.
180. Hierholzer,C., E.Kelly, K.Tsukada, E.Loeffert, S.Watkins, T.R.Billiar, and D.J.Tweardy. 1997. Hemorrhagic shock induces G-CSF expression in bronchial epithelium. *Am.J.Physiol.* 273:L1085-L1064.
181. King,J., B.P.Deboisblanc, C.M.Mason, J.M.Onofrio, G.Lipscomb, D.E.Mercante, W.R.Summer, and S.Nelson. 1995. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on acute lung injury in the rat. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 151:302-309.
182. Koeffler,H.P., J.Gasson, and A.Tobler. 1988. Transcriptional and posttranscriptional modulation of myeloid colony-stimulating factor expression by tumor necrosis factor and other agents. *Mol.Cell.Biol.* 8:3432-3438.
183. Niitsu,N., S.Iki, K.Muroi, S.Motomura, M.Murakami, H.Takeyama, A.Ohsaka, and A.Urabe. 1997. Interstitial pneumonia in patients receiving granulocyte colony-stimulating factor during chemotherapy: survey in Japan 1991-96. *Br.J.Cancer* 76:1661-1666.

184. Takahashi,Y., Y.Kobayashi, S.Chikayama, M.Ikeda, and M.Kondo. 1999. Effect of granulocyte/colony-stimulating factor on the onset of the adult respiratory distress syndrome. *Acta Haematol.* 101:124-129.
185. Hanaoka,M., K.Kubo, T.Miyahara, T.Hayano, T.Koizumi, T.Kobayashi, and M.Sekiguchi. 1998. Effect of post-treatment with granulocyte colony-stimulating factor on endotoxin-induced lung injury in sheep. *Exp.Lung Res.* 24:15-25.
186. Koizumi,T., K.Kubo, S.Koyama, M.Hanaoka, T.Hayano, T.Miyahara, T.Kobayashi, and M.Sekiguchi. 1997. Neutrophils pretreated with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) are not related to the severity of endotoxin-induced lung injury. *Exp.Lung Res.* 23:393-404.
187. Davis,K.A., T.C.Fabian, D.N.Ragsdale, L.L.Trenthem, M.A.Croce, and K.G.Proctor. 1999. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil-related changes in local host defense during recovery from shock and intra-abdominal sepsis. *Surgery* 126:305-313.
188. Hofmann,G. and W.Schobersberger. 1998. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression in pulmonary epithelial cells in vitro. *Eur.J.Pharmacol.* 358:169-176.
189. MacMicking,J., Q.-W.Xie, and C.Nathan. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu.Rev.Immunol.* 15:323-350.
190. Denis,M., D.Campbell, and E.O.Gregg. 1991. Interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate growth of a virulent strain of *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 59:1853-1856.
191. Shiratsuchi,H., J.L.Johnson, and J.J.Ellner. 1991. Bidirectional effects of cytokines on the growth of *Mycobacterium avium* within human monocytes. *J.Immunol.* 146:3165-3170.

192. Denis, M. 1992. Interleukin-6 is used as a growth factor by virulent *Mycobacterium avium*: presence of specific receptors. *Cell. Immunol.* 141:182-188.
193. Abou-Sabe, M. and T. Reilly. 1978. Insulin action on *Escherichia coli*. Regulation of the adenylate cyclase and phosphotransferase enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 542:442-455.
194. Stute, N., V. M. Santana, J. H. Rodman, M. J. Schell, J. N. Ihle, and W. E. Evans. 1992. Pharmacokinetics of subcutaneous recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children. *Blood* 79:2849-2854.
195. Fukunaga, R., E. Ishizaka-Ikeda, Y. Seto, and S. Nagata. 1990. Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Cell* 61:341-350.
196. Shimoda, K., S. Okamura, N. Harada, S. Kondo, T. Okamura, and Y. Niho. 1993. Identification of a functional receptor for granulocyte colony-stimulating factor on platelets. *J. Clin. Invest.* 91:1313.
197. Uzumaki, H., T. Okabe, N. Sasaki, K. Hagiwara, F. Takaku, M. Tobita, K. Yasukawa, S. Ito, and Y. Umezawa. 1989. Identification and characterization of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on human placenta and trophoblastic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9323-9326.
198. Hanazono, Y., T. Hosoi, T. Kuwaki, S. Matsuki, K. Miyazono, K. Miyagawa, and F. Takaku. 1990. Structural analysis of the receptors for granulocyte colony-stimulating factor on neutrophils. *Exp. Hematol.* 18:1097-1103.
199. Kaczmarek, R. S. and G. J. Mufti. 1991. The cytokine receptor superfamily. *Blood Rev.* 5:193-203.
200. Luo, G., D. W. Niesel, R. A. Shaban, E. A. Grimm, and G. R. Klimpel. 1993. Tumor necrosis factor alpha binding to bacteria: evidence for a high-affinity receptor and alteration of bacterial virulence properties. *Infect. Immun.* 61:830-835.

201. Visai,L., P.Speziale, and S.Bozzini. 1990. Binding of collagens to an enterotoxi-
genic strain of *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 58:449-455.
202. Ullberg,M., G.Kronvall, I.Karlsson, and B.Wiman. 1990. Receptors for human
plasminogen on gram-negative bacteria. *Infect.Immun.* 58:21-25.
203. Kim,K.S. and J.Le. 1992. IL-1 β and *Escherichia coli*. *Science* 258:1561-1561.
204. Treseler,C.B., R.T.Maziarz, and S.M.Levitz. 1992. Biological activity of inter-
leukin-2 bound to *Candida albicans*. *Infect.Immun.* 60:183-188.
205. Johns,M.A., J.D.Sipe, L.B.Melton, T.B.Strom, and W.R.McCabe. 1988. Endo-
toxin-associated protein: interleukin-1-like activity on serum amyloid A synthe-
sis and T-lymphocyte activation. *Infect.Immun.* 56:1593-1601.
206. Bjornson,B.H., E.Agura, J.M.Harvey, M.Johns, R.G.Andrews, and
W.R.McCabe. 1988. Endotoxin-associated protein: a potent stimulus for human
granulocytopoietic activity which may be accessory cell independent. *In-
fect.Immun.* 56:1602-1607.
207. Holmgren,A. and C.-I.Bränden. 1989. Crystal structure of chaperone protein
PapD reveals an immunoglobulin fold. *Nature* 342:248-251.
208. Abraham,E. and P.Stevens. 1992. Effects of granulocyte colony-stimulating
factor in modifying mortality from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia after
hemorrhage. *Crit.Care Med.* 20:1127-1133.

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. D. Huhn möchte ich für seine Unterstützung danken, die es mir ermöglicht hat, neben der klinischen Ausbildung in seiner Klinik auch wissenschaftlich zu arbeiten. Frau Prof. Dr. M. Alexander gebührt mein Dank für die Einführung in die klinische und wissenschaftliche Tätigkeit.

Besonderer Dank gebührt den Professoren Dr. M. Trautmann, Dr. M.E.A. Mielke und Dr. A.S. Cross, die mich auf meinem wissenschaftlichen Werdegang und auch bei der Durchführung dieser Experimente begleitet haben. Ohne ihre Mithilfe wären diese Arbeiten nicht möglich gewesen. Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. H. Hahn für seine konstruktive Kritik und für seine stete Unterstützung. Herrn Prof. Dr. W. Siegert möchte ich für seine Ermutigung und für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken. Herrn Dr. M. Unger danke ich für seine Hilfe bei der Anfertigung der Histologien, und Herrn Dr. M. Chedid für die Bereitstellung des ^{125}I -G-CSF und die Unterstützung bei den Experimenten zur Bindung von G-CSF an *K. pneumoniae*. Vielen weitere Kolleginnen und Kollegen, die namentlich hier nicht aufgeführt werden können, möchte ich für ihr Interesse an meinen Ergebnissen und für ihre kritische und fruchtbare Diskussionen danken.

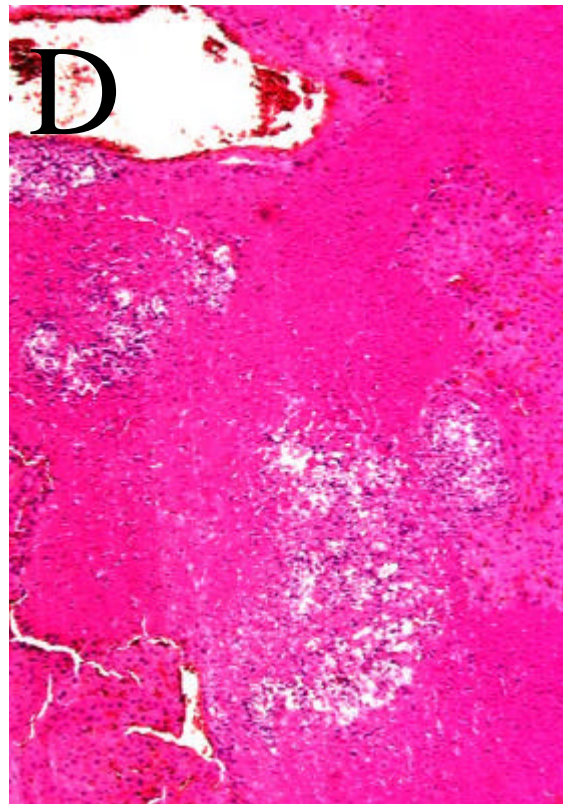
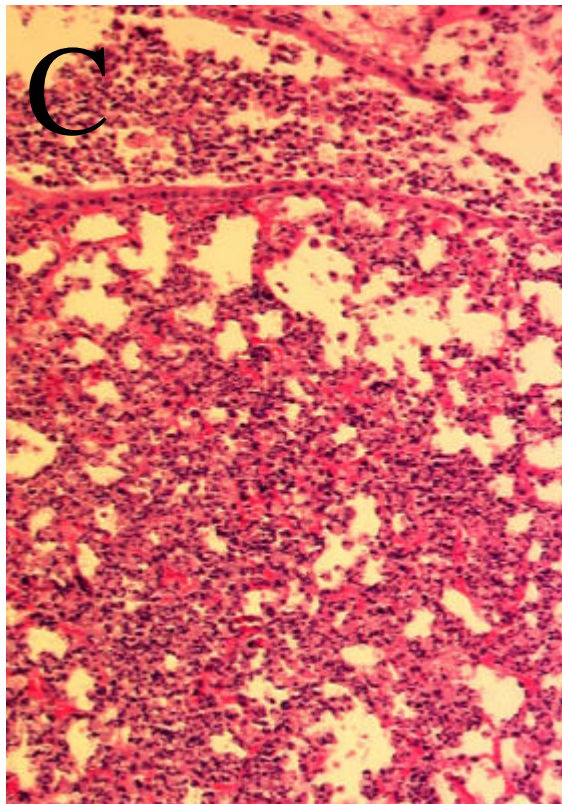
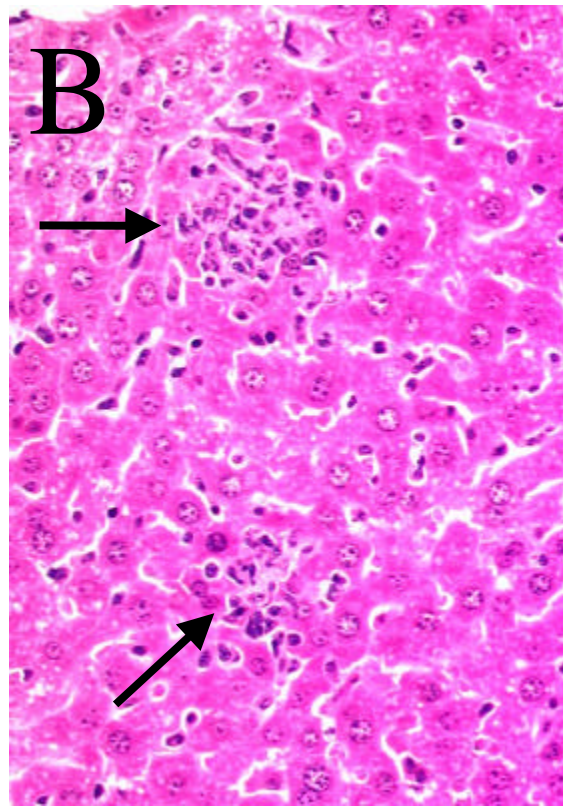
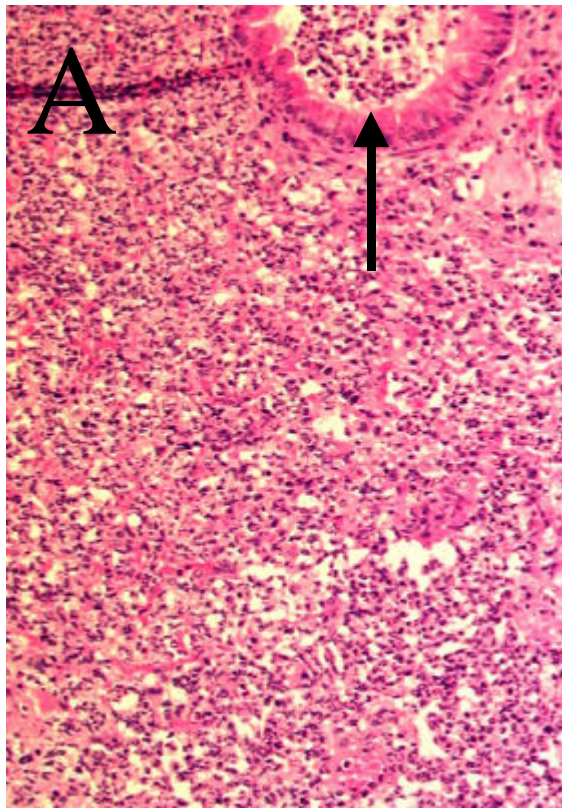
Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und insbesondere meiner Frau, die mich über viele Jahre hinweg in selbstloser Weise bei allen Vorhaben unterstützte.

9. Anhang

9.1. Farabbildungen

Abbildung 6 (Seite 90 und 91): Histologische Befunde von Kontrolltieren nach experimenteller *K. pneumoniae*-Pneumonie und von Tieren, die als Therapie G-CSF vor oder nach Induktion der Pneumonie erhielten (vgl. auch Tabelle 2).

- A. In der Lunge dieses Kontrolltieres liegt am dritten Tag der Erkrankung eine eitrig abszedierende Herdpneumonie vor, bei der auch größere Atemwege mit neutrophilen Granulozyten und Zelldetritus gefüllt sind (Pfeil) (Hämatoxylin & Eosin, x 100).
- B. Die Leber des gleichen Tieres zeigt minimale Veränderungen mit geringer Verfettung der Hepatozyten und Einzelzellnekrosen, die von histiozytären Abräumreaktionen begleitet sind (Pfeil, H&E, x 200).
- C. Dieses Tier erhielt G-CSF an Tag -2 und -1 vor Induktion der Pneumonie in einer Dosierung von 2 x 50 µg/kg. Die Lunge weist eine geringgradige Herdpneumonie auf (H&E, x 100).
- D. Identisches Tier zu C. In der Leber finden sich massive Abszesse, die mit Bakterienrasen angefüllt sind, zusammen mit konfluierenden, großflächigen Gruppenzellnekrosen (H&E, x 50).
- E. Bei diesem Tier begann die Behandlung mit G-CSF (2 x 50 µg/kg/die) 24 Stunden nach Induktion der Pneumonie. Die entzündlichen Veränderungen in der Lunge sind im Vergleich zu den Kontrolltieren weniger stark ausgeprägt (H&E, x 50).
- F. Identisches Tier zu E. Die hepatischen Abszesse sind im Gegensatz zu den prophylaktisch mit G-CSF behandelten Tieren (vgl. D.) nicht von Gruppenzellnekrosen begleitet (H&E, x 100).
- G. Identisches Tier zu E. Bei stärkerer Vergrößerung werden die Bakterienrasen innerhalb der Abszesse sichtbar. Trotz Therapie mit G-CSF sind im Verhältnis dazu nur wenige neutrophile Granulozyten zu finden, ein Befund, der sich auch in C. erheben läßt (H&E, x 400).
- H. Identisches Tier zu E. Auch die Milz weist Abszesse auf, jedoch mit geringerer Anzahl von Bakterien.



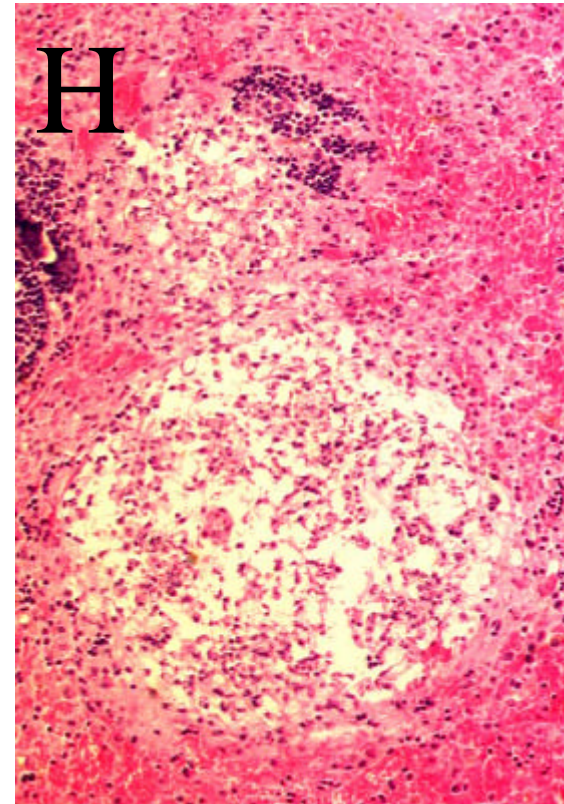
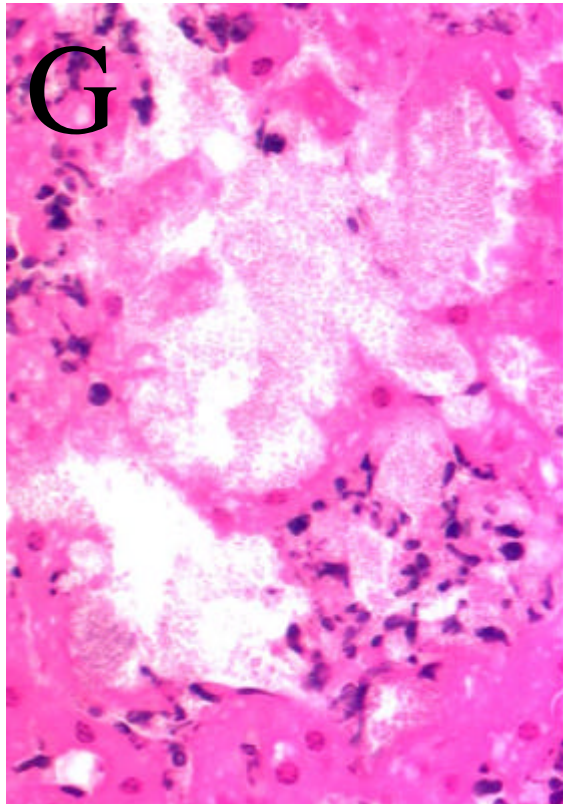
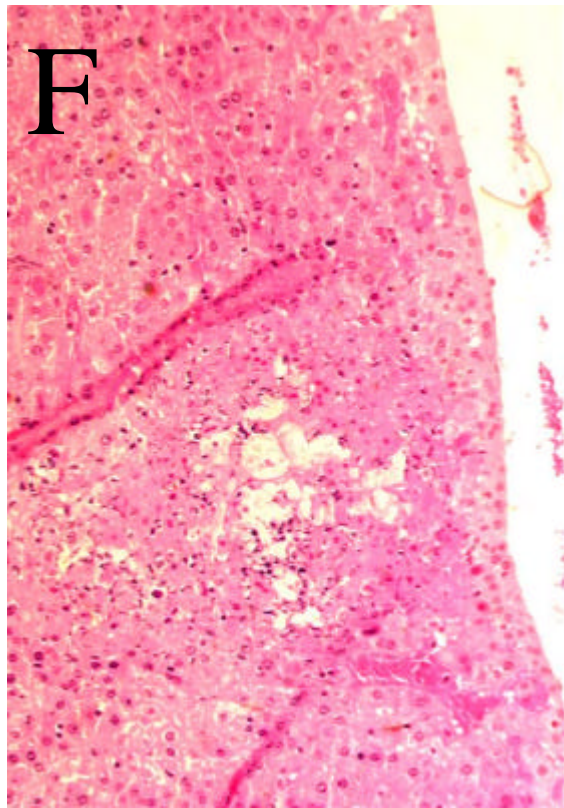
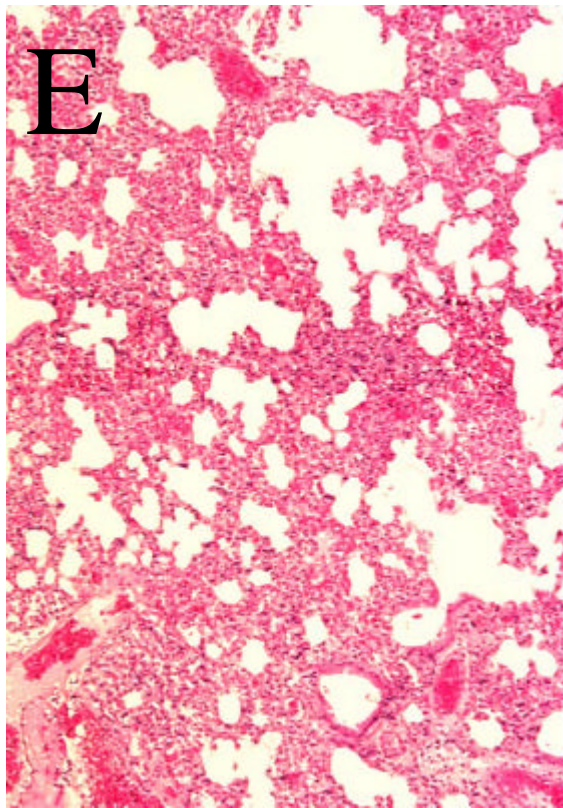
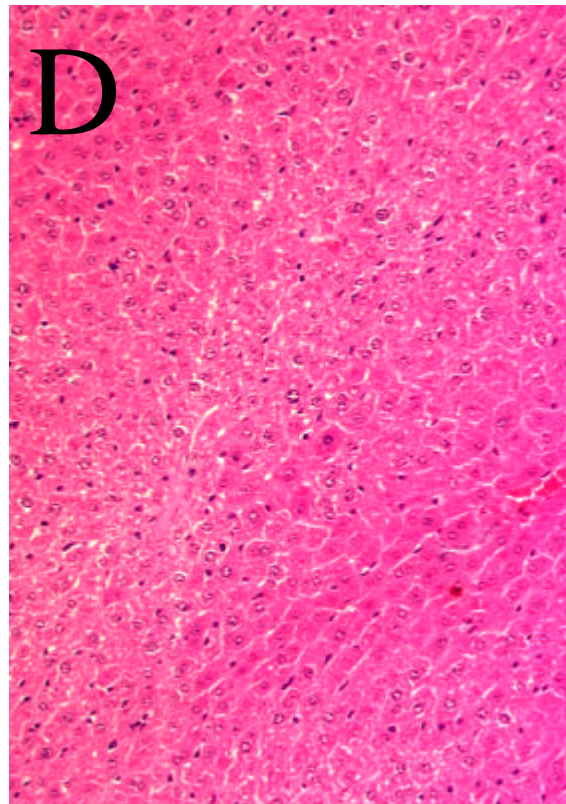
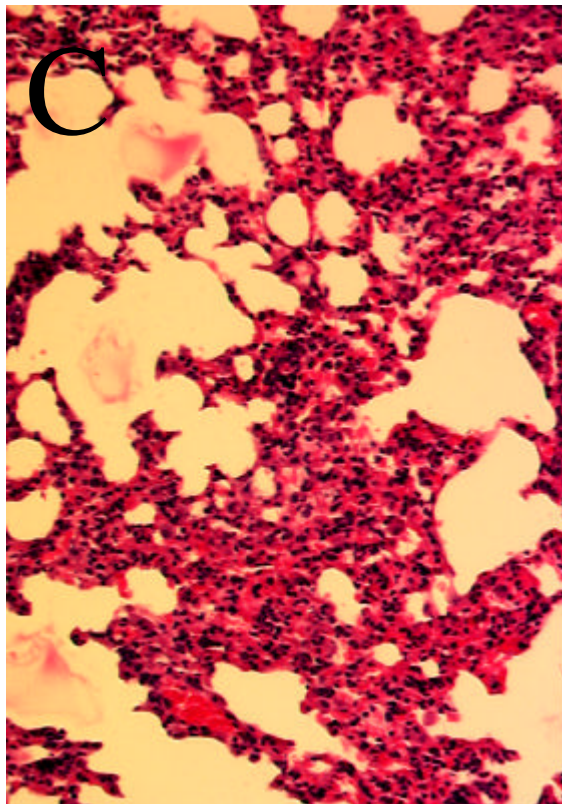
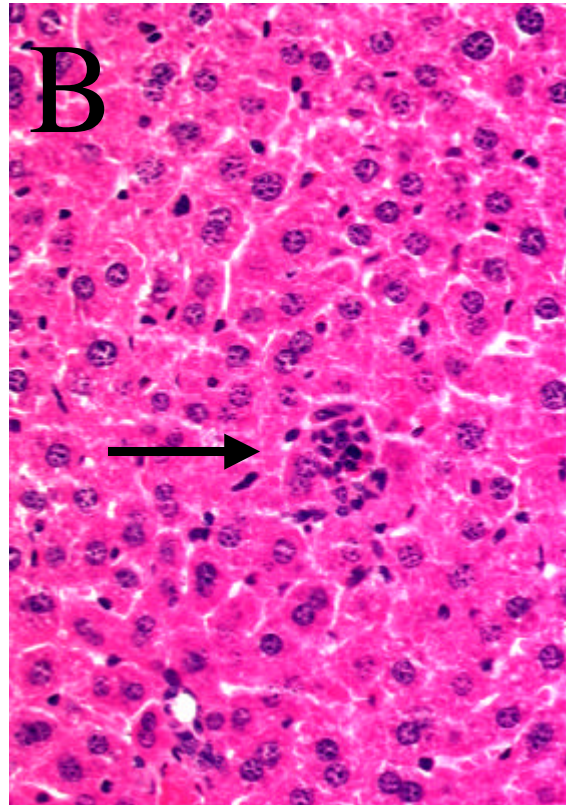
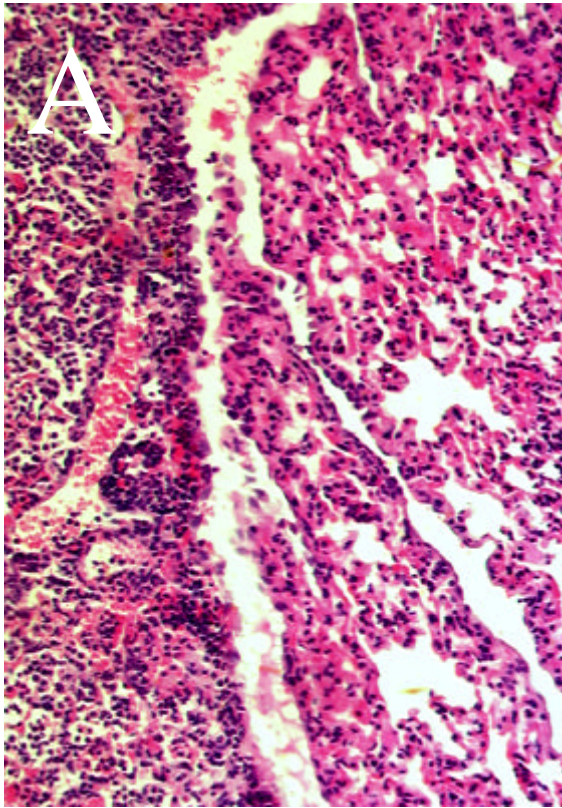


Abbildung 10 (Seite 93 und 94): Histologische Befunde bei Behandlung einer experimentellen *K. pneumoniae*-Pneumonie mit einem gegen KPS gerichteten monoklonalen Antikörper (mAb III/5-1) alleine oder in Kombination mit G-CSF (vgl. auch Tabelle 1).

- A. Dieses Tier erhielt mAb III/5-1 eine Stunde vor Induktion der Pneumonie. Die Lunge weist eine beginnende eitrig-abszedierende Herdpneumonie auf, die in ihrem Schweregrad geringer ausgeprägt ist als bei den Kontrolltieren (vergleiche Abbildung 6 A). (H&E, x 100).
- B. Identisches Tier zu A. Die in ihrer Anzahl geringeren Einzel- und Gruppenzellnekrosen weisen eine den Kontrolltieren etwa vergleichbar starke Ausprägung der Abräumreaktion auf (Pfeil, siehe auch Abbildung 6 B), die Verfettung der Hepatozyten ist aber deutlich geringer (H&E, x 200).
- C. Die Pneumonie dieses Tieres wurde mit mAb III/5-1 eine Stunde vor ihrer Induktion und mit G-CSF (2 x 50 µg/kg) an den Tagen –2 und –1 behandelt. Die entzündlichen Veränderungen in der Lunge sind am geringsten ausgeprägt (vgl. Abbildungen 6 A und 10 A).
- D. Identisches Tier zu C. Bis auf eine geringe Verfettung der Hepatozyten ist die Leber unauffällig (H&E, x 100).
- E. Dieses Tier wurde mit einer einmaligen Gabe von mAb III/5-1 24 Stunden nach Induktion der Pneumonie therapiert. Die Lunge weist eine diskrete, fokale eitrige Herdpneumonie mit Infiltration neutrophiler Granulozyten auf (H&E, x 100).
- F. Identisches Tier zu E. Die Veränderungen in der Leber mit fokalen Gruppenzellnekrosen und geringer histiozytärer Abräumreaktion sind denen der Kontrolltiere vergleichbar (Pfeil, siehe auch Abbildung 6 B) (H&E, x 200).



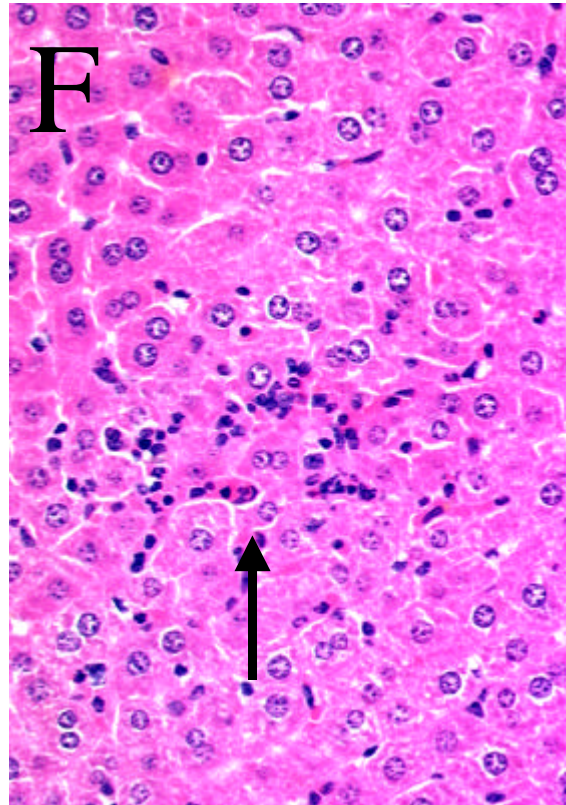
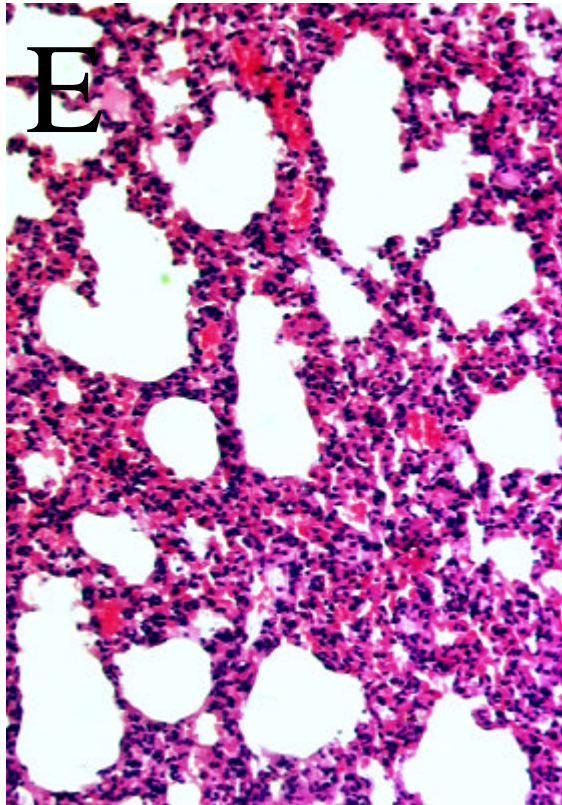
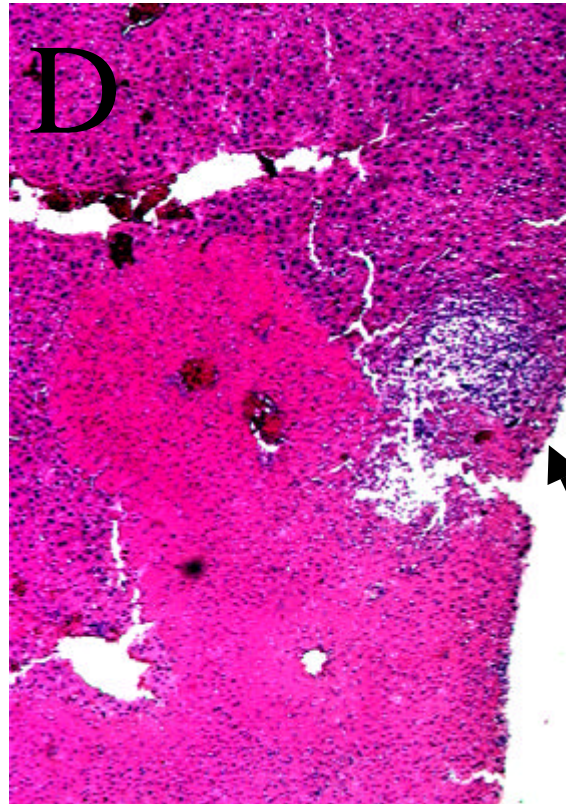
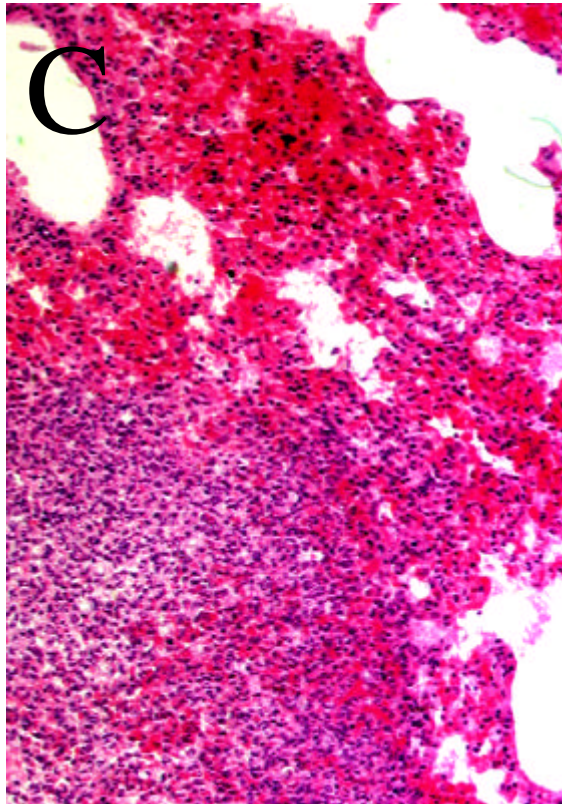
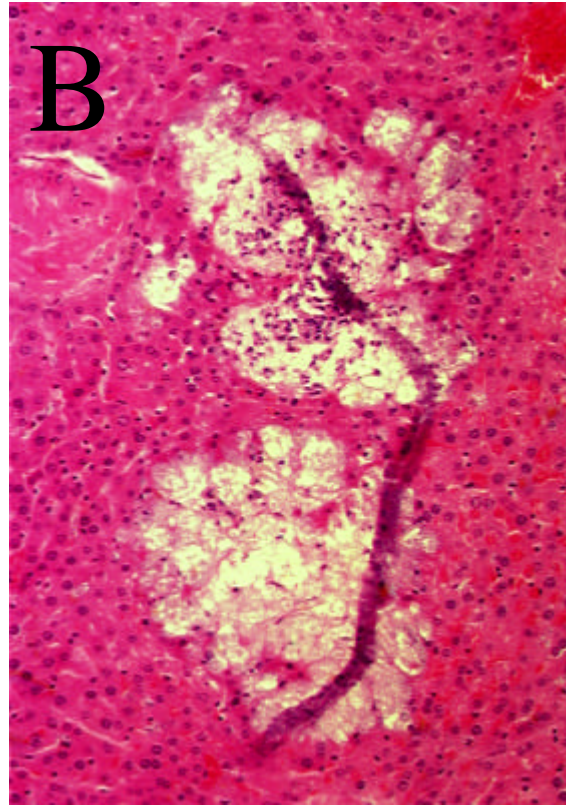
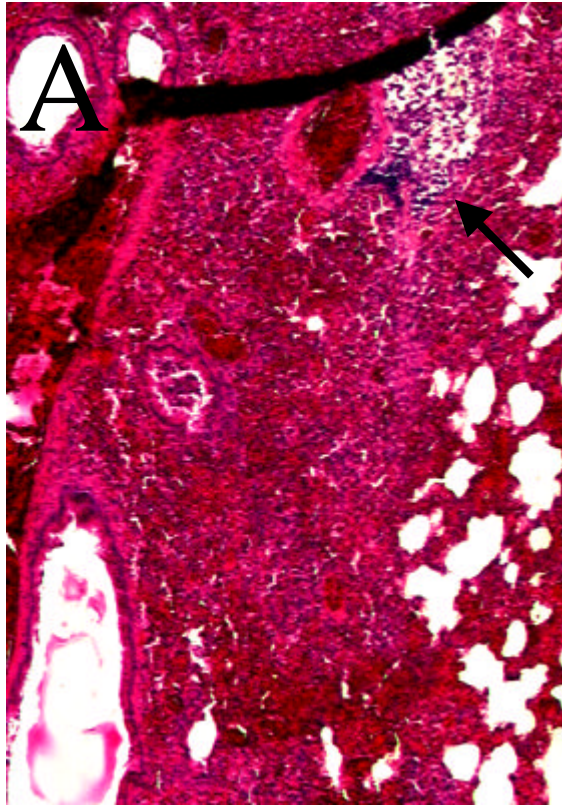


Abbildung 14 (Seite 96): Histologische Veränderungen bei experimenteller *K. pneumoniae*-Pneumonie nach Blockierung von TNF- α durch Pentoxifyllin alleine und bei Gabe von Pentoxifyllin zusammen mit G-CSF (vgl. Tabelle 1).

- A. Dieses Tier erhielt 50 mg/kg Pentoxifyllin unmittelbar sowie 6 und 12 Stunden nach Induktion der Pneumonie. Die pneumonischen Veränderungen in der Lunge sind deutlich stärker ausgeprägt als bei den Kontrolltieren. Es kommt auch zur Ausbildung von Abszessen (Pfeil) (H&E, x 50).
- B. Gleiche Behandlung wie A. In der Leber finden sich mit Bakterien beladene Abszesse, die von nur wenigen Granulozyten umgeben sind (H&E, x 100).
- C. Dieses Tier erhielt G-CSF (2 x 50 μ g/kg) an Tag -2 und -1, bevor Pentoxifyllin verabreicht wurde. Neben einer abszedierenden Pneumonie sind deutliche Einblutungen zu sehen (H&E, x 100).
- D. Identisches Tier zu C. Die Hepatozyten sind mittelstark bis stark verfettet. Große, konfluierende Gruppenzellnekrosen, die keine nennenswerte Abräumreaktion aufweisen, werden zum Teil von kleineren Abszessen (Pfeil) flankiert (H&E, x 50).



9.2. Verwendete Abkürzungen

CINC	Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant (IL-8-Homolog bei der Ratte)
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN- γ	Interferon- γ
IL-	Interleukin-
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
KBE	Koloniebildende Einheiten
KPS	Kapselpolysaccharid
LD ₅₀	Lethal dose ₅₀
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	Monoklonaler Antikörper (monoclonal Antibody)
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein-2
NO	Nitric Oxide
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α